



ISTOM

Ecole Supérieure d'Agro-Développement International

32, Boulevard du Port F.-95094 - Cergy-Pontoise Cedex
tél : 01.30.75.62.60 télécopie : 01.30.75.62.61 istom@istom.net

MEMOIRE DE FIN D'ETUDES

**Croissance en surface de *Lactobacillus sakei* en fonction
de paramètres importants lors de la fermentation des
produits carnés**



Source : Bros Manuela, 10/12/2011

Nom et Prénom de l'étudiant(e) : BAPTISTE Amandine
Promotion : 98
Domaine d'approfondissement : Industrie agro-alimentaire
au Sud – Institut des régions chaudes – Montpellier SupAgro

Stage effectué à Saint Denis, Réunion
du 17/04/2012 au 17/09/2012
Au sein du Cirad

Maître de stage : M^{me} ARNAUD
Tuteur dans l'organisme d'accueil : M^r COLLIGNAN

RÉSUMÉ

Ce stage participe à la conception d'un procédé compatible avec les conditions climatiques et économiques des pays du Sud, couplant la Déshydratation-Imprégnation par Immersion (DII) avec une fermentation lactique de surface par *Lactobacillus sakei* et un séchage. Plus précisément, l'objectif est de déterminer les limites de croissance de *L. sakei* en surface afin de mieux formuler la viande lors de la DII en vue de l'étape de fermentation.

La croissance de *L. sakei* est étudiée sur un dispositif expérimental original composé d'une membrane, support de croissance, et d'un réservoir de milieu nutritif (100 ml) se rapprochant de la composition d'une viande traitée par DII et formulable à souhait. Dans ce dispositif, les transferts de matière sont négligés à travers la membrane et le réservoir de milieu nutritif est considéré comme non-limitant et infini. Le milieu nutritif a été formulé pour faire varier quatre facteurs influençant la croissance de *L. sakei* : l'activité en eau, la teneur en sel, le pH et la concentration en acide lactique non-dissocié (AH).

Les limites de croissance déterminées sont : $0,930 < a_w < 0,945$, $4 \% \text{ p/v} < \text{NaCl} < 6 \% \text{ p/v}$, $4,0 < \text{pH} < 4,1$ et $0,4 \% \text{ p/v} < \text{AH} < 0,6 \% \text{ p/v}$. En dessous de ces seuils, la croissance s'arrête mais il n'y a pas de mort cellulaire. Ainsi, il est envisageable d'initier l'étape de fermentation à l'issue de la DII sans attendre que les concentrations en sel et en sucre se stabilisent dans les produits. Par la suite, une étude intégrant la diffusion du sucre et de l'acide lactique permettra d'évaluer leur influence sur l'étape de fermentation.

Mots clés : *Lactobacillus sakei*, fermentation en surface, activité en eau, NaCl, pH, acide lactique.

Esta pasantía participa en la concepción de un proceso de fabricación de un producto cárnico secado curado y fermentado el cuál sería compatible con el clima y las condiciones económicas de los países en vía de desarrollo. El proceso combina la deshidratación-impregnación por inmersión (DII) con una fermentación láctica de superficie por *Lactobacillus sakei* y un secado al aire. Más específicamente, el objetivo fue de determinar los límites de crecimiento de *L. sakei* a la superficie de la carne para mejor formular esta última durante la DII antes de la etapa de fermentación.

El crecimiento de *L. sakei* es investigado en un dispositivo experimental original, compuesto de una membrana que será el soporte de crecimiento y de una reserva de medio nutritivo (100 ml) que se asimila a la composición de la carne procesada por DII. En este dispositivo, la difusión de materia a través de la membrana es ignorada y la reserva de medio nutritivo se considera como no limitante. El medio nutritivo se formuló para variar cuatro factores que influyen en el crecimiento de *L. sakei*: la actividad del agua, el contenido en sal, el pH y la concentración de ácido láctico no-disociado (AH).

Los límites de crecimiento son: $0,930 < a_w < 0,945$, $4 \% \text{ p/v} < \text{NaCl} < 6 \% \text{ p/v}$, $4,0 < \text{pH} < 4,1$ et $0,4 \% \text{ p/v} < \text{AH} < 0,6 \% \text{ p/v}$. Por debajo de estos límites, el crecimiento se detiene, aunque no hay muerte celular. Así, es posible iniciar la etapa de fermentación al final de la DII sin necesidad de esperar a que las concentraciones en sal y en azúcar se estabilicen dentro del producto. Más tarde, un estudio integrando la difusión del azúcar y del ácido láctico permitirá de evaluar la duración de la etapa de fermentación.

Palabras clave: *Lactobacillus sakei*, fermentación de superficie, actividad del agua, NaCl, pH, ácido láctico.

This internship participates in the construction of a process for the production of a dried cured fermented meat product which would be compatible with the climatic and economic conditions of developing countries. The process combines Dehydration-Impregnation by Soaking (DIS) with a surface lactic fermentation by *Lactobacillus sakei* and a final air-drying step.

The growth of *L. sakei* is studied on an original experimental device composed of a membrane and a culture broth reservoir (100 ml) which is similar in composition to a DIS-treated meat. In this device, mass transfers are neglected across the membrane and the culture broth reservoir is considered as non-limiting. The culture broth was formulated to vary four factors which influence the growth of *L. sakei*: water activity, salt content, pH and non-dissociated lactic acid concentration (AH).

The determined growth limits are: $0,930 < a_w < 0,945$, $4 \% \text{ w/v} < \text{NaCl} < 6 \% \text{ w/v}$, $4,0 < \text{pH} < 4,1$ et $0,4 \% \text{ w/v} < \text{AH} < 0,6 \% \text{ w/v}$. Underneath these limits, growth is stopped but there is no cell death. Therefore it is possible to initiate fermentation step right at the end of DIS without waiting for salt and sugar concentrations to equilibrate within the product. In further research, a study which takes diffusion of sugar and lactic acid into account will allow to assess the length of the fermentation step.

Keywords: *Lactobacillus sakei*, surface fermentation, water activity, NaCl, pH, lactic acid.

TABLE DES MATIÈRES

RÉSUMÉ.....	I
TABLE DES MATIÈRES	II
TABLE DES ILLUSTRATIONS	IV
NOMENCLATURE.....	V
REMERCIEMENTS	VI
INTRODUCTION.....	1
ANALYSE BIBLIOGRAPHIQUE.....	3
I. Présentation de <i>Lactobacillus sakei</i>	3
II. Influence des conditions de culture sur la croissance de <i>Lactobacillus sakei</i> en milieu liquide.....	4
II.1. Milieux utilisés	4
II.2. Courbe de croissance bactérienne	4
II.3. Paramètres influençant la croissance de <i>L. sakei</i>	5
II.3.a. Les substrats carbonés et facteurs de croissance	5
II.3.b. Paramètres environnementaux.....	6
II.3.c. Produits issus du métabolisme.....	8
III. Stratégies expérimentales d'étude de la croissance des bactéries en milieu solide.....	9
III.1. Equipements utilisés lors de la fermentation en milieu solide	9
III.1.a. Equipements à l'échelle du laboratoire.....	9
III.1.b. Equipements à l'échelle pilote	11
III.2. Régulation des paramètres en fermentation en milieu solide.....	12
MATÉRIEL ET MÉTHODES	14
I. Protocole général.....	14
I.1. Présentation du dispositif	14
I.2. Déroulement des cinétiques	16
I.2.a. Préparation et stérilisation du matériel	16
I.2.b. Préparation de l'inoculum	16
I.2.c. Inoculation et incubation des dispositifs	17
I.2.d. Prélèvement du milieu MYG et de la membrane	17
II. Analyses microbiologiques et physico-chimiques	18
II.1. Analyses microbiologiques	18
II.1.a. Dénombrement bactérien des membranes	18
II.1.b. Efficacité du décollement des bactéries de la membrane	19
II.1.c. Contamination du milieu MYG	19
II.2. Analyses physico-chimiques	19
II.2.a. Mesure du pH	19
II.2.b. Mesure de l'activité de l'eau	19
II.2.c. Dosage du D-glucose.....	19
II.2.d. Dosage du D-lactate et du L-lactate	20
III. Plan d'expériences	21
PRÉSENTATION DES RÉSULTATS	23
I. Validation du dispositif	23
I.1. Non-contamination du milieu MYG	23

I.2.	Efficacité du décollement des bactéries de la membrane lors de leur dénombrement.....	24
I.3.	Milieu infini et non-limitant.....	24
I.4.	Répétabilité des résultats obtenus	25
II.	Plan d'expériences.....	26
II.1.	Croissances microbiennes lors des essais réalisés.....	26
II.1.a.	Essais « Aw »	26
II.1.b.	Essais « NaCl ».....	28
II.1.c.	Essais « PH »	29
II.1.d.	Essais « AH »	31
II.2.	Evolution du pH du milieu MYG contenu dans le dispositif lors des essais réalisés.....	33
DISCUSSION	35
I.	Performances du dispositif.....	35
I.1.	Milieu infini et non-limitant.....	35
I.2.	Induction de la phase stationnaire	35
II.	Influence des paramètres sur la croissance de <i>L. sakei</i>	37
II.1.	Influence de l'a _w sur la croissance de <i>L. sakei</i>	37
II.2.	Influence de la concentration en NaCl sur la croissance de <i>L. sakei</i>	38
II.3.	Influence du pH et de la concentration en acide lactique non-dissocié sur la croissance de <i>L. sakei</i>	39
III.	Initiation et évolution de la croissance de <i>L. sakei</i>	40
III.1.	Initiation de la croissance de <i>L. sakei</i>	40
III.2.	Réponse de <i>L. sakei</i> aux évolutions environnementales lors de la fermentation.....	41
IV.	Différence de croissance de <i>L. sakei</i> en milieu liquide et en milieu solide	42
V.	Microbiologie des produits carnés	43
VI.	Transfert du procédé dans les pays du Sud.....	44
CONCLUSION	45
BIBLIOGRAPHIE	46
TABLE DES ANNEXES	51

TABLE DES ILLUSTRATIONS

Figure 1 : Courbe de croissance bactérienne en fonction du temps	4
Figure 2 : Schéma du réacteur colonnes mis au point par l'Orstom	10
Figure 3: Schéma du réacteur plateaux de type koji	11
Figure 4 : Dispositif de croissance sur membrane	14
Figure 5 : Inoculation du dispositif de croissance sur membrane	15
Figure 6 : Niveaux de milieu dans le dispositif de croissance sur membrane pendant l'incubation.....	15
Figure 7 : Niveau critique de milieu dans le dispositif de croissance sur membrane	15
Figure 8 : MYG ajusté au delà de la limite de rodage.....	16
Figure 9 : Préparation et dénombrement de l'inoculum de <i>L. sakei</i>	17
Figure 10 : Dilutions réalisées pour le dénombrement des membranes.....	18
Figure 11 : Evolution du pH du milieu MYG en fonction du temps pour l'essai de référence	24
Figure 12 : Croissance de <i>L. sakei</i> en dispositif (essai de référence).....	25
Figure 13 : Ln (N/N_0) en fonction du temps lors de la phase exponentielle de croissance (essai de référence).....	26
Figure 14 : Croissance de <i>L. sakei</i> en dispositif (essais « Aw »).....	27
Figure 15 : Ln (N/N_0) en fonction du temps lors de la phase exponentielle de croissance de <i>L. sakei</i> (essais « Aw »)	28
Figure 16 : Croissance de <i>L. sakei</i> en dispositif (essais « NaCl »)	28
Figure 17 : Ln (N/N_0) en fonction du temps lors de la phase exponentielle de croissance de <i>L. sakei</i> (essais « NaCl »).....	29
Figure 18 : Croissance de <i>L. sakei</i> en dispositif (essais « PH »).....	30
Figure 19 : Ln (N/N_0) en fonction du temps lors de la phase exponentielle de croissance de <i>L. sakei</i> (essais « pH »)	30
Figure 20 : Croissance de <i>L. sakei</i> en dispositif (essais « AH »).....	31
Figure 21 : Ln (N/N_0) en fonction du temps lors de la phase exponentielle de croissance de <i>L. sakei</i>	31
Figure 22 : Evolution du pH en fonction du temps pour chaque essai réalisé	33
Figure 23 : Influence de la molécule sel sur la croissance de <i>L. sakei</i>	38
Figure 24 : Influence de la molécule AH sur la croissance de <i>L. sakei</i>	39
Tableau 1: Plan d'expériences.....	21
Tableau 2 : Dénombrements du milieu MYG	23
Tableau 3 : Evolution des concentrations en D-glucose et en acide lactique du milieu MYG pour l'essai de référence.....	24
Tableau 4 : Plan d'expériences pour les essais « Aw »	27
Tableau 5 : Plan d'expériences pour l'essai « NaCl ».....	28
Tableau 6 : Plan d'expériences pour les essais « PH »	29
Tableau 7 : Plan d'expériences pour les essais « AH »	31
Tableau 8 : <i>L. sakei</i> présents sur la membrane lorsque le milieu devient non-limitant	35
Tableau 9 : Récapitulatif du nombre de <i>L. sakei</i> (N) lors de l'entrée en phase stationnaire et de N_{max} pour chaque essai	36
Tableau 10 : Caractéristiques des filets de viande à l'issue d'un traitement de DII de 5h (Bros et al., 2012).....	40
Tableau 11 : Récapitulatif de μ_{max} , G et de λ pour chaque essai.....	41

NOMENCLATURE

ADP : adénosine diphosphate
AH : acide lactique non-dissocié
ATP : adénosine triphosphate
 a_w : activité de l'eau
°C : degré Celsius
Cirad : Centre de Coopération International en Recherche Agronomique pour le Développement
cm : centimètre
 cm^2 : centimètre carré
 CO_2 : dioxyde de carbone
DII : Déshydratation-Imprégnation par Immersion
EPS : Exo Poly Saccharide
EPT : Eau Peptonée Tamponnée
et al : et collaborateurs
FAMT : Flore Aérobie Mésophile Totale
g : gramme
G : temps de génération cellulaire
g/l : gramme/litre
G6P-DH : glucose-6-phosphate déshydrogénase
h : heure
HK : hexokinase
Inra : Institut National de la Recherche Agronomique
 λ : durée de la phase de latence
l : litre
L. sakei : *Lactobacillus sakei*
LDH : lactate déshydrogénase
 μ : vitesse de croissance
 μ_{max} : vitesse spécifique de croissance maximale
 μl : microlitre
ml : millilitre
min : minute
MRS : milieu de Man, Rogosa & Sharpe
MYG : Meat extract, Yeast extract and Glucose
 NAD^+/NADH : nicotinamide adénine dinucléotide
 NH_3 : ammoniac
PCA : Plate Count Agar
Persyst : **P**erformance des **S**ystèmes de Production et de Transformation Tropicaux
PES : Polyethersulfone
p/v : poids/volume
qPCR : quantitative Polymerase Chain Reaction
UFC : Unité Formant Colonie
UMR : Unité Mixte de Recherche

REMERCIEMENTS

Je tiens à adresser mes remerciements les plus sincères aux personnes qui m'ont apporté leur aide et qui ont contribué à l'élaboration de ce mémoire

Je voudrais tout d'abord adresser mes remerciements à Mme Manuela BROS pour sa disponibilité, sa rigueur et ses judicieux conseils qui ont contribué à la réalisation de mon stage et de mon mémoire. Je lui suis reconnaissante de l'engagement et de la patience qu'elle a eu envers moi durant ces cinq mois.

J'adresse ma gratitude à Mme Elodie Arnaud de m'avoir suivi et prodigué de nombreux conseils sur la rédaction et l'orientation de mon mémoire.

J'adresse également mes remerciements à M. Antoine Collignan pour avoir accepté d'être mon tuteur de stage ainsi que pour ses conseils et remarques.

J'exprime toute ma gratitude au personnel du CIRAD de la MRST pour leurs accueils vivants et chaleureux.

Enfin je souhaite remercier toute les personnes qui ont participé à la relecture de ce travail.

INTRODUCTION

Dans les pays du Sud, les produits d'origine animale, lorsqu'ils ne sont pas consommés à l'état frais, sont généralement transformés par des techniques traditionnelles telles que le salage, le séchage et le fumage. Les principaux produits issus de ces procédés sont : le kilishi (Sahel), le biltong (Afrique du Sud), le charque et la carne do sol (Brésil) ainsi que le boucané (Réunion) (Collignan et al., 2001). Afin d'être mieux conservés et contrecarrer les conditions climatiques et économiques des pays du Sud (températures et humidité élevées, manque d'infrastructures, etc.), les techniques de transformation conduisent à des produits qui sont le plus souvent trop secs et/ou trop salés pour être consommés en l'état (Collignan et al., 2008). De plus, ils peuvent présenter une flore microbienne supérieure aux normes sanitaires et peuvent contenir des bactéries responsables de toxi-infections alimentaires (Mbawala et al., 2010).

Dans les pays du Nord, le développement de produits carnés à humidité intermédiaire et avec des teneurs en sel limitées est rendu possible par les conditions climatiques (températures modérées et faible humidité relative) et/ou grâce aux infrastructures mises en œuvre pour maîtriser les paramètres environnementaux (enceintes climatiques).

Ces techniques ne sont pas applicables en pays du Sud car les procédés de fabrication tels qu'ils se déroulent dans les pays du Nord sont trop lents ce qui pose problème notamment en termes de dégradation de la viande par la prolifération des micro-organismes. Par exemple, lors de la fabrication de saucissons secs, l'étape d'étuvage (pendant laquelle a lieu la fermentation lactique) dure de 48 à 92 h à 22 °C et est suivie d'un séchage de 1 à 2 semaines à 13 °C (Durand, 1999b). Ceci explique que l'on retrouve peu de produits fermentés ou à humidité intermédiaire dans les zones tropicales.

Au vu de cette problématique, l'UMR (Unité Mixte de Recherche) QualiSud au sein du département Persyst (**Per**formance des **Sys**tèmes de Production et de Transformation Tropicaux) du Cirad (Centre de coopération Internationale en Recherche Agronomique pour le Développement) cherche à mettre en place un procédé de stabilisation des produits carnés adapté aux conditions tropicales et facile à mettre en œuvre à petite échelle. L'idée est de coupler une DII (Déshydratation-Imprégnation par Immersion) en solution ternaire (eau/sel/sucre) de morceaux de viandes à une fermentation lactique de surface par *Lactobacillus sakei* et un séchage à l'air afin d'obtenir des produits carnés stables possédant une humidité intermédiaire et une teneur en sel limitée. Le détail des opérations unitaires est présenté en Annexe 1.

La DII permet de formuler la viande ainsi que de la pré-stabiliser en abaissant l'activité de l'eau (a_w), du fait de l'imprégnation en sel et en sucre et de la déshydratation osmotique. A l'issue de ce prétraitement, la teneur en glucides fermentescibles de la viande doit être suffisante pour permettre une fermentation lactique. Cependant, la formulation en sel et la baisse d'activité en eau doivent être telles qu'elles pré-stabilisent le produit au maximum sans empêcher la croissance de *L. sakei*. La fermentation lactique permettrait alors d'améliorer la qualité sanitaire du produit et de le protéger contre les flores d'altération par quatre actions (Hutkins, 2006) : colonisation du milieu, mobilisation des ressources nutritionnelles, production d'acides organiques et production de bactériocines, molécules capables d'inhiber spécifiquement le développement de certaines flores pathogènes et d'altération (Kayalvizhi et Gunasekaran, 2008). Cette étape présente également l'avantage de permettre le développement de composés aromatiques grâce à la glycolyse, la lipolyse et la protéolyse qui

sont des réactions du catabolisme des micro-organismes (Montel et al., 1998). Le séchage final permet d'ajuster la teneur en sel et en eau du produit.

Une thèse, débutée en décembre 2009, a pour objectif d'optimiser le couplage DII et fermentation lactique de surface.

Un premier travail (Bros et al., 2012) a permis de valider la faisabilité du couplage de la DII à une fermentation lactique. Des filets de bœuf ayant fait l'objet de traitements de DII dont les conditions différaient de par le temps de traitement et la concentration en sel de la solution ont ensuite été inoculés en surface par *L. sakei*. Lors de l'incubation à 25 °C, seuls les filets traités pendant 5 h dans la solution contenant 10 g/l de sel ont montré des signes de fermentation : présence d'acide D-lactique et population élevée de *L. sakei*. Les autres morceaux présentaient une a_w trop basse et/ou une flore microbienne endogène trop importante pour que les *L. sakei* ensemencés deviennent majoritaires (Verdy, 2008).

Ces travaux menés sur les filets de viande ont souligné la complexité de réaliser une étude sur aliments réels du fait de la variabilité de la matière première en termes de pH, de teneur en acide lactique et de la qualité microbiologique initiale. De plus, l'étude de l'impact des paramètres de la formulation de DII est complexe d'une part du fait de la difficulté de formuler à souhait la viande et d'autre part à cause de la non connaissance des caractéristiques à la surface des morceaux de viande où a lieu la fermentation. En effet, il est nécessaire de prendre en compte les gradients de pH, d'activité en eau et de teneur en sel, sucre ou acide lactique pouvant exister dans l'aliment immédiatement après le traitement de DII ou au cours du métabolisme fermentaire du fait des coefficients de diffusion du sel, des sucres et de l'acide lactique entre le cœur et la surface de la viande.

De ce fait, un dispositif expérimental a été conçu dans une deuxième partie de la thèse afin d'étudier plus facilement l'influence de paramètres environnementaux sur la croissance de bactéries en surface d'un milieu solide maîtrisé et dont les caractéristiques sont facilement formulables et non-variables dans le temps dans une première étape.

Ce stage s'inscrit dans la partie de la thèse qui concerne le travail avec le dispositif expérimental et a pour but d'étudier l'effet de quelques paramètres de formulation de DII et du métabolisme fermentaire sur la croissance de *L. sakei*. Il s'agira notamment de définir, pour les paramètres étudiés, les conditions limites de croissance de la bactérie.

Dans un premier temps, une étude bibliographique présentera les bactéries lactiques du genre *L. sakei*, l'influence des conditions de culture sur leur croissance en milieu liquide ainsi que les stratégies expérimentales d'étude de la croissance des bactéries en milieu solide. Dans un second temps, le matériel et méthodes utilisés seront développés. Enfin les résultats et la discussion seront présentés.

ANALYSE BIBLIOGRAPHIQUE

I. Présentation de *Lactobacillus sakei*

Les *Lactobacillus sakei* sont des bacilles Gram positif, procaryotes et hétérotrophes. Ils sont immobiles, asporulés et ont des exigences nutritionnelles complexes en ce qui concerne les acides aminés, les peptides, les vitamines, les sels, les acides gras et les glucides fermentescibles. Ces bactéries sont généralement regroupées par paires ou en chaînes courtes (Dellaglio et al., 1994).

Dans la taxonomie, les *Lactobacillus sakei* appartiennent à la lignée des Firmicutes, à la classe des *Bacillus*, à l'ordre des *Lactobacillales*, à la famille des *Lactobacillaceae*, au genre *Lactobacillus* et à l'espèce *sakei* (Garrity et Holt, 2001).

Les souches de *L. sakei* sont hétérofermentaires facultatives. En conditions normales (milieu suffisant en sucre), elles sont homofermentaires (Bekhouche, 2006) mais lorsque le milieu devient pauvre en sucre elles deviennent hétérofermentaires :

- par la voie homofermentaire, les bactéries dégradent 1 mol de glucose pour synthétiser 2 mol de pyruvate qui seront ensuite réduites en lactate par la voie de la lactate déshydrogénase ;
- par la voie hétérofermentaire, elles dégradent les hexoses et les pentoses (ribose, fructose, galactose...) pour donner des quantités égales d'acide lactique, d'éthanol et de CO₂ (Hofvendahl et Hahn-Hägerdal, 1998).

Les souches de *L. sakei* font partie de la flore naturelle de la viande. Elles sont utilisées comme ferment dans la fabrication des produits carnés :ensemencées lors du procédé de fabrication, elles se développent rapidement et grâce à leur propriété acidifiante, elles entraînent une coagulation des protéines (texturant) et participent au développement de la flaveur (Marceau et al., 2002). Elles permettent également de stabiliser les aliments et d'augmenter la sécurité sanitaire des produits carnés en inhibant la croissance des flores pathogènes et d'altération. En effet, *L. sakei* peut produire des bactériocines qui inhibent le développement de la flore d'altération. Ces bactériocines sont des sakéines qui sont actives contre les autres bactéries lactiques et contre les pathogènes tels que *Escherichia coli*, *Staphylococcus aureus* ou *Listeria monocytogenes* (Champomier-Vergès et al., 2001 ; Papathomopoulou et Kotzekidou, 2009). Les bactériocines agissent en formant des pores dans la membrane cytoplasmique ce qui entraîne des perturbations des fonctions cellulaires. Les bactéries résistantes aux bactériocines ont la capacité de modifier la composition de leur membrane ce qui les rend plus résistantes (modification du ratio acide gras saturé/acide gras insaturé et adaptation de la longueur des chaînes lipidiques afin de rigidifier leur membrane) (Labioui et al., 2005). D'autres agents antimicrobiens sont produits par *L. sakei* : l'acide lactique, le peroxyde d'hydrogène, et le dioxyde de carbone (Dortu et Thonart, 2009).

Pour toutes ces raisons, cette bactérie a été choisie dans le procédé innovant de conservation des produits carnés mis en place par l'UMR QualiSud afin de participer à la stabilisation de la viande.

Le paragraphe suivant présente une courbe de croissance bactérienne type et l'influence de facteurs sur la croissance de *L. sakei*, à notre connaissance toujours étudiée en milieu liquide.

II. Influence des conditions de culture sur la croissance de *Lactobacillus sakei* en milieu liquide

II.1. Milieux utilisés

En milieu liquide, les bactéries lactiques sont, le plus souvent, étudiées dans des fermenteurs en mode batch (fermentation se déroulant sans addition de milieu supplémentaire) contenant le milieu MRS (Man, Rogosa & Sharpe). Ce milieu contient (Biokar-Diagnostics) :

- des peptones, du glucose, des sels de manganèse et de magnésium qui apportent les éléments nutritifs indispensables à la croissance des lactobacilles ;
- du Tween 80 (mélange d'esters oléiques) qui est une source d'acides gras nécessaires à la croissance de ces bactéries ;
- du phosphate dipotassique qui contribue à stabiliser le pH au cours de la croissance ;
- du citrate d'ammonium et de l'acétate de sodium qui constituent des substances inhibitrices du développement de la plupart des contaminants tels que les streptocoques et les moisissures.

Ce milieu peut être reformulé à souhait afin d'étudier la croissance de *L. sakei* en fonction de un ou plusieurs paramètres (teneurs en sel, acide lactique, glucose, nitrites, température....) ou sur un milieu se rapprochant des caractéristiques de produits carnés ayant déjà subi une transformation comme par exemple dans les études de Verluyten et al. (2003) et de Devlieghere et al. (2000).

II.2. Courbe de croissance bactérienne

Lorsqu'un milieu nutritif estensemencé avec des bactéries, une courbe de croissance peut être établie en fonction du temps. Cette courbe comporte six phases (Figure 1) (Baudry et Brezellec, 2006) :

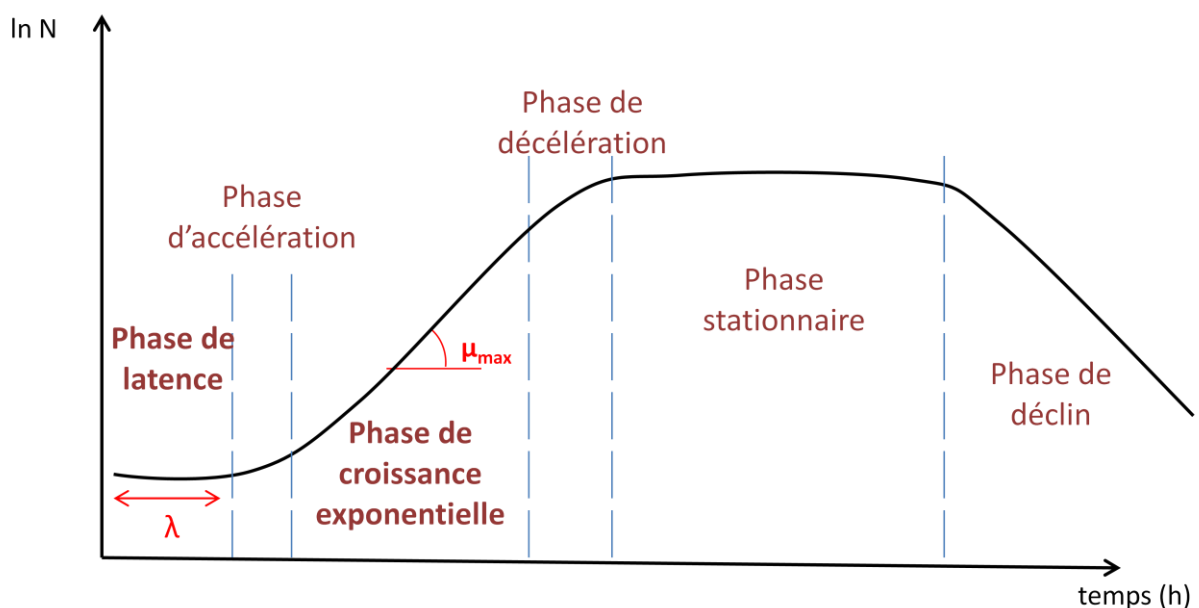


Figure 1 : Courbe de croissance bactérienne en fonction du temps

Avec N : nombre de bactéries lactiques (UFC/ml)

- Phase de latence : cette phase correspond à la durée d'adaptation des bactéries au milieu : durant cette période les bactéries ne se multiplient pas, elles préparent leur mécanique cellulaire en synthétisant des molécules spécifiques (enzymes, molécules de lutte contre le stress osmotique, etc.) afin de s'adapter au milieu. La durée de la phase de latence (λ) dépend de l'histoire des cellules et de la composition du milieu (Prescott et al., 2010).
- Phase d'accélération : pendant cette phase, les premières bactéries commencent à se diviser.
- Phase de croissance exponentielle : pendant cette phase, les bactéries se multiplient à une vitesse de croissance maximale. Deux paramètres peuvent être calculés afin de caractériser le développement de la population : la vitesse spécifique de croissance maximale (μ_{\max}) et le temps de génération (G) de la population (Leyral et Vierling, 2007).
 - μ_{\max} correspond à l'accroissement maximal de la population bactérienne par unité de temps. Il représente la pente de la courbe $X = \ln(N(t))$ en fonction du temps et peut varier en fonction de la nature du milieu, de la température, du pH, etc ;
 - G correspond au temps écoulé entre deux divisions cellulaires ($G = \frac{\ln 2}{\mu_{\max}}$).
- Phase de décélération : durant cette phase, la vitesse de croissance régresse notamment à cause de l'encombrement stérique, de l'épuisement des ressources nutritionnelles du milieu de culture et/ou de l'accumulation de déchets produits par les bactéries (Prescott et al., 2010).
- Phase stationnaire : pendant cette phase, le taux de croissance devient nul ($\mu = 0$). Les bactéries qui se multiplient remplacent celles qui meurent (Leyral et Vierling, 2007).
- Phase de déclin : cette phase traduit la décroissance de la population bactérienne consécutive à la lyse des cellules bactériennes : le taux de croissance devient négatif ($\mu < 0$). Les causes de la mort sont identiques à celles évoquées lors de la phase de décélération et de la phase stationnaire (Delahaye, 2008).

Dans le cas de la mise en place du procédé faisant l'objet de cette étude, il est important que la phase de latence soit la plus courte possible et que μ_{\max} soit le plus élevé possible. Ces deux conditions réunies favorisent une fermentation rapide et limitent la dégradation de la viande par les flores d'altération. Il est donc important de connaître les conditions de croissance de *Lactobacillus sakei* afin d'optimiser ces deux paramètres.

II.3. Paramètres influençant la croissance de *L. sakei*

La croissance de *L. sakei* est influencée par les substrats carbonés et les facteurs de croissance présents dans le milieu, les paramètres environnementaux et par les produits issus du métabolisme bactérien qui peuvent ralentir ou inhiber la croissance.

II.3.a. Les substrats carbonés et facteurs de croissance

- Dégradation du glucose : pour produire de l'énergie par la voie homofermentaire, les bactéries dégradent 1 mol de glucose pour produire 1 mol d'acide lactique. Lorsqu'elles ne peuvent plus tirer leur énergie des molécules de glucose ou qu'il n'y a pas de glucose dans le milieu, les bactéries lactiques dégradent les sucres plus complexes tels que le ribose,

l'arabinose, le lactose, le galactose pendant la phase exponentielle de croissance (Champomier-Verges et al., 1999).

L'étude de la consommation de glucose par *L. sakei* fait l'objet de peu de publications et dépend de la souche utilisée et des conditions expérimentales. Leroy et de Vuyst (1999) notent qu'à un pH de 5,5 et à 25 °C, pour un μ_{\max} de 0,38 h⁻¹ la consommation moyenne de glucose est de 0,26 g/l lors de la phase exponentielle de croissance. Sinz et Schwab (2012) mesurent une consommation de glucose de l'ordre de 1,5 g/l après 48 h de fermentation d'un milieu initialement inoculé avec 10⁹ UFC/ml de *L. sakei*. La consommation finale de glucose varie entre 1,3 et 1,8 g/l.

- Dégradation de l'arginine : *L. sakei* est capable de dégrader l'arginine pour produire de l'adénosine triphosphate (ATP) nécessaire à sa survie. Cette voie de dégradation débute toujours au début de la phase stationnaire lorsque la concentration en glucose devient inférieure à 1 mmol/l même si le milieu possède une concentration suffisante en sucres complexes (Rimaux et al., 2011).

La dégradation de l'arginine entraîne une production d'ammoniaque (NH₃) et de dioxyde de carbone (CO₂). Il a été remarqué par Montel et Champomier (1987) puis par Lebert et al. (2007a) que lorsque les bactéries utilisaient l'arginine comme source d'énergie pendant la phase stationnaire, le pH augmentait en fin de fermentation (autour de 7,2) à cause de la production de NH₃, de peptides et d'acides aminés.

- Nature et concentration des facteurs de croissance : *Lactobacillus sakei* est une bactérie auxotrophe : elle ne peut pas synthétiser elle-même les éléments nécessaires à sa croissance et possède des exigences complexes en peptides, carbones, vitamines, sels, minéraux et acides gras. Par exemple, Devlieghere et al. (1998) ont montré que *L. sakei* avait une meilleure croissance en présence de fortes concentrations de manganèse (12 mg/kg) et que dans les produits carnés, la concentration en manganèse est insuffisante pour stimuler la croissance (0,12 mg /kg).

II.3.b. Paramètres environnementaux

Les principaux paramètres environnementaux influençant la croissance sont : la température, le pH, l'activité en eau, la concentration en sel et la présence d'oxygène.

- Température : *L. sakei* possède une température optimale de croissance de 30 °C pour laquelle μ_{\max} varie entre 0,45 et 0,55 h⁻¹ (Marceau et al., 2003). La température joue un rôle important car elle influence la production d'acide lactique et des bactériocines : la production d'acide lactique est maximale lorsque la fermentation est réalisée à 30 °C tandis que la production de bactériocines est optimale à des températures inférieures à 30 °C (Marceau et al., 2002).

La température peut aussi influencer l'isomérisation de l'acide lactique formé. En effet, chez *L. sakei*, l'activité L-(+)-LDH est importante à 25, 30, 35 °C alors que l'activité D-(-)-LDH l'est moins à 30 °C mais nulle à 35 °C. De ce fait, aux températures comprises entre 30 et 35 °C, il y a une plus grande production de L-(+)-lactate (Lino et al., 2003).

A pH 6,5, *L. sakei* peut se développer à des températures comprises entre 5 °C et 35 °C (Ammor et al., 2005). À 0 °C les bactéries ne meurent pas : elles se maintiennent en vie. De plus, plus les bactéries sont soumises à des températures éloignées de l'optimal 30 °C, plus

leur survie est importante : dans un milieu MRS à 30 °C et à pH 5,6, la durée de vie de *L. sakei* est de 14 jours à 4 °C alors qu'elle est de 3 jours à 30 °C.

Il a également été remarqué que plus la température diminue plus le temps de génération augmente : il est de 1 h à 30 °C, de 4 h à 15 °C et de 48 h à 4 °C (Marceau et al., 2003).

- pH : *L. sakei* possède un pH optimal de croissance de 6,5. Une diminution du pH modifie la perméabilité de la membrane en bloquant la diffusion des cations vers l'intérieur des cellules, ralentit le métabolisme enzymatique et influe sur le ratio acide lactique dissocié/acide lactique non-dissocié présent dans le milieu de culture. *L. sakei* peut se développer à des pH compris entre 3,9 et 9 selon les souches (Hufner et al., 2007).

Pendant la phase exponentielle de croissance et selon la souche, *L. sakei* peut induire une diminution de pH allant de 0,01 à 0,07 unité par heure : 40 h sont nécessaires aux bactéries lactiques (naturellement isolées de la viande) en milieu liquide pour abaisser le pH de 6,5 à un pH compris entre 4,8 et 5,6 (Hufner et Hertel, 2008). Cependant, il a été remarqué que les bactéries préalablement soumises à un stress lié au froid (20 min à 4 °C dans du milieu de culture MRS) sont plus performantes en termes de vitesse d'abaissement du pH. Il leur faut 24 h pour abaisser le pH de 6,5 à 5,6.

- Activité de l'eau (a_w) : l'activité de l'eau du milieu influence la croissance microbienne. En effet, les bactéries ont besoin d'eau libre pour croître et solubiliser les nutriments. L'abaissement de l'activité de l'eau dans le milieu provoque une diminution de la croissance puis une déshydratation cellulaire entraînant la mort. A un pH de 6,5 et à une température de 30 °C, lorsque l' a_w est de 1, μ_{\max} est compris entre 0,45 et 0,55 h⁻¹ (Samapundo et al., 2010). Pour une a_w du milieu de culture de 0,98, μ_{\max} est de 0,38 h⁻¹ et pour une a_w de 0,95, μ_{\max} est de 0,17 h⁻¹ (Leroy et de Vuyst, 1999).

- NaCl : de fortes concentrations en sel inhibent la croissance des bactéries lactiques en abaissant l'activité de l'eau du milieu. De plus selon Theys et al. (2010), l'effet des ions Na⁺ serait toxique pour la bactérie. Parmi 36 souches de *L. sakei* isolées dans du saucisson, la majorité se développent jusqu'à 6,5 % de sel et une minorité jusqu'à 9 % (Marceau et al., 2003).

Plus la teneur en sel est élevée plus la durée de la phase de latence augmente : à 30 °C et à un pH de 6,5 la phase de latence est d'environ 1 h pour une teneur en sel nulle et de 4 h pour une teneur en sel de 4 %. La vitesse spécifique de croissance maximale est quant à elle de 0,45 h⁻¹ à 30 °C en présence de 4 % de sel et de 0,05 h⁻¹ en présence de 8 % de sel. D'autre part, lorsque que le milieu contient 4 % de sel, μ_{\max} est similaire à celui obtenu dans des conditions optimales de croissance, ce qui signifie que *L. sakei* s'adapte bien aux teneurs en sel moyennes rencontrées dans les produits carnés (Doßmann et al., 1996).

Le sel, tout comme la température et le pH, joue un rôle sur la durée de vie des cellules. En effet, à 30 °C avec un pH de 5,6 elles vivent 3,5 jours sans ajout de sel et 10 jours avec 9 % de sel (Marceau et al., 2003). En combinant une température de 4 °C et une concentration en sel de 9 %, les cellules peuvent survivre 28 jours.

- Oxygène : la majorité des bactéries lactiques sont anaérobies. Cependant, *Lactobacillus sakei* croît presque aussi bien en aérobie qu'en anaérobie (Champomier-Verges et al., 1999).

II.3.c. Produits issus du métabolisme

Les principaux produits issus du métabolisme de *L. sakei* sont l'acide lactique, le peroxyde d'hydrogène et les bactériocines.

- Acide lactique : selon le pH, la production d'acide lactique peut être majoritairement présente sous la forme dissociée ($\text{CH}_3\text{CHOHCOO}^-$ (A^-) + H_3O^+) ou sous la forme non-dissociée ($\text{CH}_3\text{CHOHCOOH}$ (AH)). L'acide lactique sous la forme non-dissociée a un effet toxique. En effet, $\text{CH}_3\text{CHOHCOOH}$ diffuse au travers de la membrane et se dissocie dans le cytoplasme en $\text{CH}_3\text{CHOHCOO}^-$ + H_3O^+ ce qui provoque un abaissement du pH intracellulaire et a pour conséquence la déstabilisation de la mécanique cellulaires (Matsumoto et al., 2004). L'étude de la croissance de *L. sakei* en fonction de la teneur en AH présente dans le milieu de culture n'a pas fait l'objet de publication. Cependant, le volume d'acide lactique produit par *L. sakei* a été mesuré en fonction des paramètres du milieu (Aasen et al., 2000). D'autres études évaluent le volume minimum d'acide lactique (produit par *L. sakei*) nécessaire pour inhiber les pathogènes au cours de la fermentation (Janssen et al., 2006).

- Peroxyde d'hydrogène : En présence d'oxygène, les bactéries lactiques produisent du peroxyde d'hydrogène (H_2O_2) : cette molécule doit être éliminée car son accumulation devient toxique pour les cellules non équipées de système de protection capable de dégrader ce composé (catalase). Ainsi, l'avantage du peroxyde d'hydrogène est qu'il inhibe la croissance de certains micro-organismes pathogènes prolongeant ainsi la durée de vie des produits (Chaillou et al., 2005). *L. sakei* dispose des enzymes nécessaires pour dégrader $2 \text{H}_2\text{O}_2$ en $2 \text{H}_2\text{O} + \text{O}_2$.

- Bactériocines : les bactériocines produites aident *L. sakei* à devenir la flore majoritaire dans le milieu de culture. A 25 °C et à un pH initial de 5,5, la production de bactériocines est optimale lorsqu'il n'y a pas de sel dans le milieu. Lorsque la concentration en sel devient supérieure à 6 %, la production de la bactériocine sakéine devient faible (Leroy et de Vuyst, 1999).

Cependant certaines études ont montré que ce sont principalement le pH et la température qui influencent la production de sakéine (Parente et Ricciardi, 1994) : la production maximale de bactériocines se situerait en dessous des seuils optimums de croissance en pH et température.

L. sakei est utilisée dans les procédés de fermentation car elle s'est adaptée évolutivement aux contraintes retrouvées dans les procédés de fabrication des produits carnés (Papathomopoulou et Kotzekidou, 2009). En milieu liquide, les bactéries se développent plus aisément qu'en milieu solide car il s'agit d'un milieu homogénéisé par l'agitation : les nutriments sont immédiatement disponibles et la mobilité des micro-organismes est facilitée. En milieu solide, la croissance bactérienne est limitée par les phénomènes de diffusion des nutriments et par l'accumulation de substances inhibitrices à diffusion lente autour des bactéries (Lebert et al., 2004).

De ce fait, les différentes possibilités d'étude de la croissance bactérienne en milieu solide vont être étudiées afin de voir lesquelles sont transposables aux bactéries lactiques.

III. Stratégies expérimentales d'étude de la croissance des bactéries en milieu solide

Contrairement à la fermentation en milieu liquide qui est particulièrement bien adaptée aux organismes unicellulaires tels que les bactéries et les levures, la fermentation en milieu solide est adaptée aux organismes mycéliens. En effet, l'agitation nécessaire pour homogénéiser les milieux liquides entraîne des contraintes de cisaillements que peu de champignons sont capables de supporter (Van de Lagemaat et Pyle, 2001). De plus, de nombreuses bactéries lactiques étant anaérobies, la fermentation en surface des milieux solides ne leur est pas adaptée : c'est donc tout naturellement vers les micro-organismes fongiques (qui sont de plus aérobies) que la fermentation en milieu solide a trouvé le plus d'application (Rimbault, 1998).

Dans l'industrie, la fermentation à l'aide de champignons est utilisée dans la fabrication d'aliments fermentés tels que le koji (moût du riz obtenu après fermentation par des moisissures du genre *Aspergillus*) ou le tempeh (fermentation de graines de soja cuites par *Rhizopus oligosporus*) mais aussi dans la valorisation des sous produits issus de l'agriculture, dans la désodorisation de bio-gaz et dans la production d'enzymes (amylases, cellulases, protéolases), d'acides organiques (acide citrique, acide malique), d'alcaloïdes, de certains arômes... (Rodriguez Couto et Angeles Sanroman, 2005).

Certaines bactéries (*Pseudomonas*, *Bacillus*) sont utilisées en milieu solide dans les procédés de compostage et d'ensilage. Certaines levures (*Saccharomyces cerevisiae*) sont employées dans les procédés de fabrication d'éthanol et de produits alimentaires tels que le pain ou le riz (Rimbault, 1998).

Afin d'étudier et d'améliorer l'étape de fermentation en milieu solide dans les procédés industriels, différents types de réacteurs ont été conçus.

III.1. Equipements utilisés lors de la fermentation en milieu solide

En milieu solide, les équipements utilisés peuvent être classés en deux catégories : les réacteurs employés à l'échelle du laboratoire et les réacteurs utilisés à l'échelle pilote.

III.1.a. Équipements à l'échelle du laboratoire

Les principaux équipements de laboratoire utilisés pour la fermentation en milieu solide sont les boîtes de Pétri, les Erlenmeyers à col large et les boîtes en aluminium dans lesquels sont coulés des milieux gélosés. Ces dispositifs sont généralement utilisés pour des études exploratoires car seule la température de l'enceinte peut être régulée : il n'y a pas de système d'aération ni d'agitation (Durand, 1998).

Les principales études exploratoires de croissance bactérienne réalisées en milieu solide ont été initiées pour des micro-organismes pathogènes. En effet, Lebert et al. (2004) ont étudié la croissance de *Listeria innocua* en surface en fonction de l' a_w du milieu modifiée par ajout de sucre, de sel ou de glycérol. Pour cela, ils ont incubé des cylindres de géloses, préalablement trempés dans une solution d'inoculation, dans des boîtes de Pétri. Le pH, l' a_w et la teneur en eau ont été suivis au cours des cinétiques.

Lebert et al. (2007b) ont également étudié la croissance en surface de *L. innocua* lors d'un procédé de séchage. L'ensemencement des blocs de géloses s'est fait par dépôt en surface

(5 min) d'un papier filtre stérile préalablement trempé dans une solution d'inoculation (15 min).

Dans les autres études recensées à l'échelle exploratoire, la croissance en milieu solide est étudiée dans la masse (Smith et Palumbo, 1980 ; Noriega et al., 2008). Le milieu de culture est le plus souvent préparé à l'aide d'un agent solidifiant ayant un point de solidification inférieur à 40 °C. Les bactéries sont incorporées au milieu lorsqu'il est sous la forme liquide ; le tout est homogénéisé puis réparti dans des Erlenmeyers ou des boîtes de Pétri afin que les milieux se solidifient. Ils sont ensuite incubés dans des enceintes climatiques. Les principaux facteurs suivis sont le pH et l' a_w (Theys et al., 2008). Antwi et al (2007) ont suivi la croissance de *Lactobacillus lactis* et de *L. innocua* dans un gel Brain Heart Infusion : ils ont également suivi la teneur en acide lactique et la concentration en glucose au cours du temps.

Afin de travailler sur des volumes plus grands, 3 types de fermenteur en milieu solide ont été développés pour les essais de laboratoire :

- Le réacteur colonnes : le laboratoire de recherche de l'Orstom a travaillé sur ce réacteur dans les années 1975-1980 (Figure 2). Il est composé de petites colonnes (4 cm de diamètre et 20 cm de long) qui sont placées dans un bain d'eau afin de réguler la température. Les colonnes sont préalablement remplies de milieu inoculé en conditions stériles. De l'air saturé en eau traverse chaque colonne afin de renouveler l'air de chaque culture. L'analyse de la respiration microbienne est rendue possible en reliant le réacteur colonnes à une chromatographie gazeuse. Des sondes de température et d'humidité relative permettent de suivre l'évolution de ces deux paramètres au cours du temps (Durand, 2003). L'inconvénient de ce système est que la prise d'échantillon n'est pas possible : un réacteur est sacrifié pour chaque point de cinétique. De plus, la croissance n'est pas toujours uniforme à l'intérieur du milieu du fait de l'absence d'agitation et les modifications de température ne sont pas toujours maîtrisées (Robinson et Nigam, 2002).

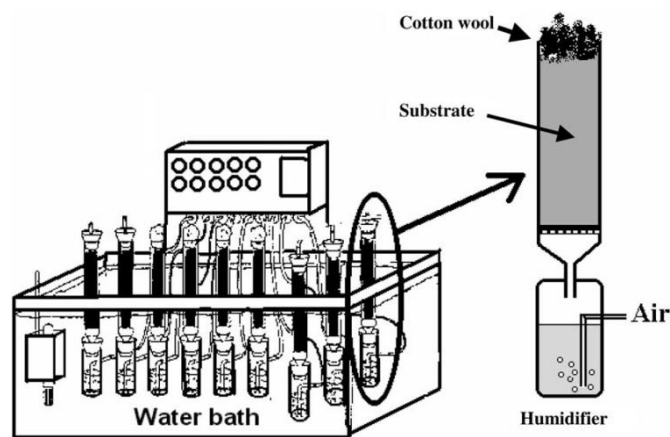


Figure 2 : Schéma du réacteur colonnes mis au point par l'Orstom

L'Inra (Institut National de la Recherche Agronomique) a développé une nouvelle génération de réacteur colonnes quelques années plus tard pouvant contenir jusqu'à 1 litre de substrat en intégrant un système de régulation de la température à l'intérieur de la colonne (circuit d'eau froide) et d'un couvercle chauffant (Assamoi et al., 2009).

- Le réacteur tambour : ce concept de réacteur a été développé par l'Orstom en partenariat avec une équipe néerlandaise de l'université de Wageningen. Il est basé sur une

agitation continue du milieu solide afin d'augmenter l'apport d'oxygène aux micro-organismes. Trois variantes de tambour ont été mises au point (Annexe 2) : le tambour rotatif simple, le tambour rotatif perforé et le tambour à pales (Duchiron et Copinet, 2012).

Ce type de réacteur a permis une amélioration du contrôle de la température et de l'humidité relative. Cependant, il n'a pas pu être adapté à des volumes supérieurs à 2 m² car la couche de substrat n'occupe que 10 à 40 % du volume du tambour afin d'optimiser l'aération. En présence d'une trop importante quantité de substrat l'échauffement du milieu n'est plus régulé. L'inconvénient de ce système est que l'agitation peut modifier la structure du milieu solide et endommager les micro-organismes ensemencés sur le support (Robinson et Nigam, 2002).

- Le réacteur Zymotis : ce réacteur a été breveté par l'Orstom. Il s'agit de plaques verticales alignées les unes à côté des autres dans lesquelles de l'eau froide circule afin de réguler la température. Entre chaque plaque, le milieu solide préalablement inoculé est inséré. De l'air thermostaté circule en bas de chaque plaque. L'inconvénient de ce système est que le travail en asepsie totale est impossible. De plus, au cours de la fermentation, le milieu de culture se rétracte ce qui diminue la surface d'échange entre les plaques et le substrat : la régulation de la température devient plus difficile (Duchiron et Copinet, 2012).

L'adaptation de ce type de procédé à des échelles plus grandes est compliquée à cause de la difficulté à réguler les transferts d'oxygène et de température. Malgré ces contraintes certains réacteurs ont été conçus afin de réaliser des études à l'échelle pilote.

III.1.b. Equipements à l'échelle pilote

A l'échelle pilote, deux systèmes de réacteur ont été majoritairement développés : le réacteur plateaux de type koji et le réacteur en couche profonde. Dans ces deux systèmes, le procédé d'aération du substrat est renforcé.

- Le réacteur plateaux de type koji : ce réacteur (Figure 3) est composé de simples claies perforées, dans lesquelles est déposé un substrat organique humidifié (épaisseur maximale 15 cm) et inoculé avec une souche microbienne. Le système est ensuite mis à incuber dans une enceinte climatique pendant plusieurs jours. L'aération de ce type de procédé n'est pas forcée : l'air circule librement autour des plateaux.

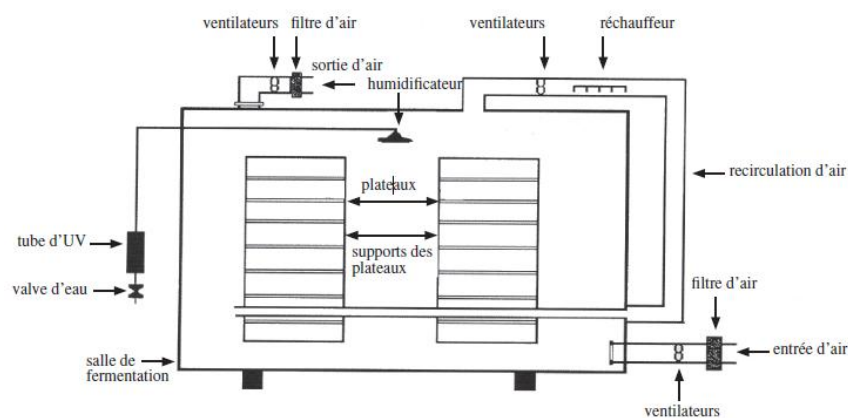


Figure 3: Schéma du réacteur plateaux de type koji

Ce procédé, facile d'utilisation et de mise en place a pour inconvénient une utilisation non homogène du substrat : les micro-organismes exploitent uniquement les nutriments en

surface. Il est également difficile d'utiliser ce type de réacteur pour des fermentations en milieu stérile. Des améliorations ont été effectuées en ajoutant des pales afin d'homogénéiser le substrat (Assamoi et al., 2009).

- Réacteur à couche profonde : ce réacteur, développé par l'Inra (Annexe 3), possède une capacité de 1,6 m³. Il est équipé d'un système de régulation de la température (brassage périodique du milieu, contrôle du débit d'air) et de l'humidité relative (pulvérisation d'eau). L'inconvénient est qu'il ne peut pas s'utiliser en conditions stériles. Une étude de faisabilité a été réalisée afin d'adapter ce réacteur à l'échelle industrielle avec des cuves de 50 t (Xue et al., 1992).

L'utilisation de réacteurs lors de la fermentation en milieu solide pose des difficultés au niveau de la régulation de la température et du pH.

III.2. Régulation des paramètres en fermentation en milieu solide

Les procédés de fermentation en milieu solide sont simples à mettre en place mais plus compliqués à réguler que ceux en milieu liquide. La température est le paramètre le plus difficile à réguler : les supports utilisés ont souvent une faible conductivité thermique (composition et faible teneur en eau du milieu) et les micro-organismes produisent de la chaleur via leur métabolisme respiratoire ce qui provoque une accumulation de chaleur en surface. Des études ont montré que les champignons filamenteux pouvaient produire une augmentation de 20 °C de la température d'incubation (Pandey, 2001). L'échauffement du support peut affecter le développement des micro-organismes et provoquer un assèchement du milieu de culture et une diminution de l' a_w du milieu. La régulation de la température se fait principalement grâce à des thermosenseurs ou des sondes métaboliques (Bellon-Maurel et al., 2003).

Tout comme en milieu liquide, les variations de pH résultent principalement de la synthèse de métabolites tels que l'acide lactique. En fermentation solide, la mesure du pH est plus compliquée à mettre en œuvre avec des pH-mètres classiques : certains auteurs utilisent cependant des électrodes à pH après mise en suspension du substrat dans de l'eau distillée afin d'obtenir une idée du pH final (Bellon-Maurel et al., 2003).

L'aération n'est généralement pas un facteur limitant en milieu solide : cependant elle est à prendre en compte car elle permet un apport constant d'oxygène, d'éliminer les produits issus du métabolite tels que le CO₂ et les composés volatiles et de réguler la température (Muthulakshmi et al., 2011).

Même si la fermentation en milieu solide possède certains avantages économiques, cette technique présente de nombreux inconvénients qui font qu'elle est peu utilisée. En effet, les micro-organismes employés doivent pouvoir s'adapter à des substrats ayant une a_w égale ou inférieure à 0,98. De plus, les mesures sont plus difficiles à réaliser et les produits plus difficiles à isoler et à purifier qu'en milieu liquide : l'estimation de la biomasse est approximative car les micro-organismes sont inséparables du substrat. Généralement ce sont les composés issus du métabolisme des micro-organismes qui sont dosés (O₂, CO₂, ATP et production de la biomasse telle que les protéines, les acides nucléiques) afin d'estimer la population (Singhania et al., 2009).

Enfin, en milieu solide, les phénomènes de diffusion ne sont pas négligeables : le milieu n'étant pas toujours homogénéisé, la surface s'épuise plus rapidement en nutriments ce qui

peut engendrer une privation des nutriments essentiels des micro-organismes et ainsi ralentir leur croissance (Givry, 2006).

L'ensemble de ces inconvénients font que lorsqu'il est possible de réaliser une étude en milieu liquide cette option est favorisée par rapport à l'étude la fermentation en milieu solide.

Dans le cadre de l'étude de l'influence de paramètres sur la croissance de *L. sakei*, l'objectif est de pouvoir étudier la croissance bactérienne en surface d'un milieu maîtrisé et dont les caractéristiques sont facilement formulables et non-variables dans le temps. Or, au vu des réacteurs et dispositifs présentés ci-dessus, cela n'était pas possible : un dispositif a donc été conçu spécialement pour cette étude.

MATÉRIEL ET MÉTHODES

I. Protocole général

Un protocole spécifique à la réalisation de l'étude de *Lactobacillus sakei* en milieu solide a été mis en place. Un dispositif a été conçu, un plan d'expériences a été élaboré, des dénombrements microbiologiques et des analyses physico-chimiques ont été réalisés.

I.1. Présentation du dispositif

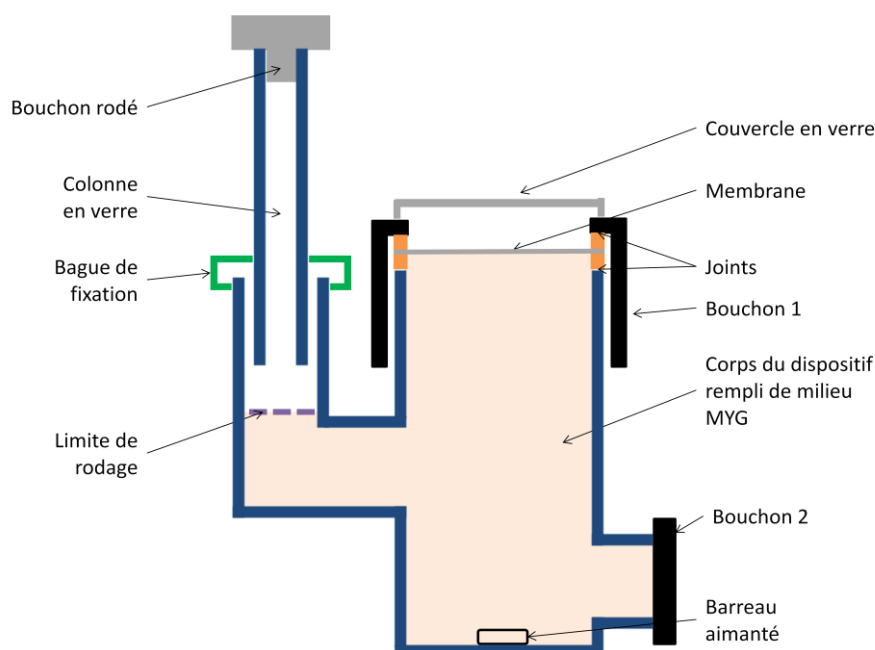


Figure 4 : Dispositif de croissance sur membrane

Le dispositif (Figure 4) a été conçu afin d'étudier la croissance de *L. sakei* en surface en fonction de paramètres environnementaux qui ne varient pas au cours du temps. Il s'agit d'une membrane en polyethersulfone (PES) de 47 mm de diamètre et de 0,45 μm de porosité posée sur un réservoir d'environ 100 ml. Le réservoir est rempli avec un milieu nutritif appelé MYG (Meat extract 10 g/l, Yeast extract 5 g/l et Glucose 5 g/l). La formulation du MYG vise à se rapprocher de la composition d'une viande issue du procédé de DII.

Le réservoir de 100 ml a été conçu pour que le volume de MYG soit considéré comme « infini » pendant la croissance de *L. sakei* jusqu'à atteindre la phase stationnaire. Pendant cette période le milieu de culture est non-limitant : il ne subit pas de variation telle que l'abaissement du pH et il ne représente pas un facteur limitant pour la croissance en termes de disponibilité des nutriments et d'accumulation de produits toxiques.

Un barreau aimanté a été introduit afin d'homogénéiser le bouillon de culture durant la fermentation. La bague de fixation permet de fixer la colonne amovible au corps du dispositif. Le « bouchon 2 » sert à évacuer le bouillon en fin d'essai sans enlever la membrane. Le couvercle évite la contamination de la membrane et limite l'évaporation : le bouillon reste au

contact de la membrane durant toute la durée d'incubation, ce qui permet aux bactéries d'accéder aux nutriments de manière continue et non-limitante et de la même manière d'évacuer les déchets toxiques tels que l'acide lactique.

Pour remplir le dispositif, il faut dévisser le « bouchon 1 » et verser du milieu MYG jusqu'à ras bord. Une fois le « bouchon 1 » remis, il est nécessaire de continuer le remplissage par la colonne afin de chasser les bulles d'air, puis d'ajuster le niveau du milieu dans la colonne afin de se placer au niveau de la limite de rodage.

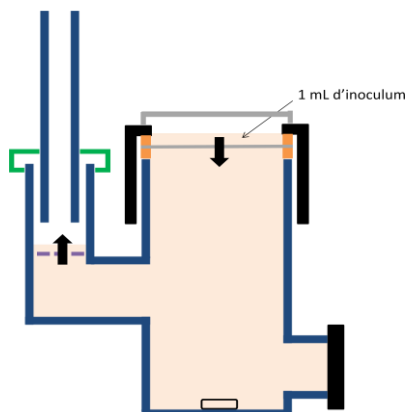


Figure 5 : Inoculation du dispositif de croissance sur membrane

Après ensemencement de la face supérieure de la membrane avec un inoculum de *L. sakei* (Figure 5), celui-ci s'infiltre d'une part par capillarité et d'autre part grâce à la différence de hauteur du bouillon entre la colonne d'eau et le dispositif. En effet, sous l'effet de la gravité le niveau du bouillon a tendance à essayer de s'égaliser entre la colonne et le corps du dispositif. Si le milieu nutritif n'est pas en contact avec la membrane lors de l'ensemencement, l'inoculum ne traverse pas la membrane et reste à la surface : cette observation a permis de mettre en évidence le phénomène de « transfert par capillarité ».

Si la colonne est fermée (par le bouchon rodé) lors de l'ensemencement, l'inoculum ne traverse pas la membrane car le bouillon MYG ne peut pas remonter dans la colonne en chassant l'air.

Lors de l'incubation (Figure 6), le bouillon reste en contact avec la membrane ce qui permet aux bactéries déposées sur la membrane d'être alimentées en continu. Après l'inoculation, lorsque le bouchon est remplacé sur la colonne, l'air est comprimé ce qui pousse légèrement le bouillon de culture vers le bas de la colonne et le plaque contre la membrane. De par ce phénomène, et parce que la pression de l'air n'est pas assez importante pour traverser la membrane, il est impossible que des bulles d'air s'infiltrent sous la membrane.

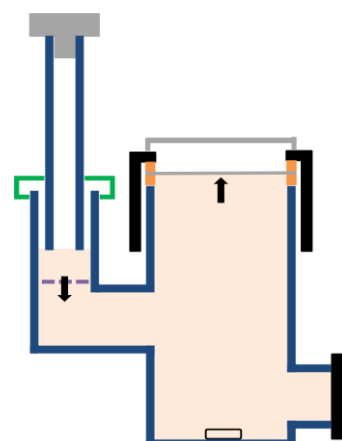


Figure 6 : Niveaux de milieu dans le dispositif de croissance sur membrane pendant l'incubation

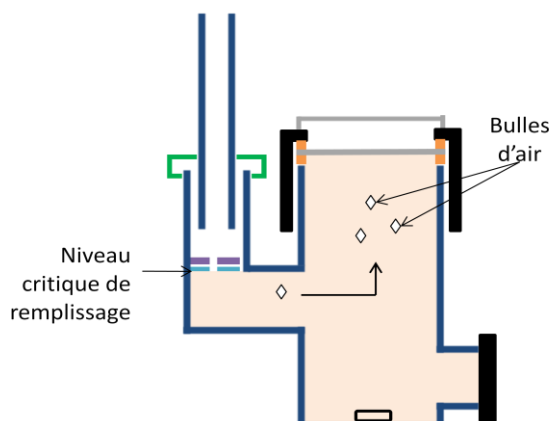


Figure 7 : Niveau critique de milieu dans le dispositif de croissance sur membrane

Si le niveau du bouillon est ajusté sous la limite de rodage (Figure 7) des bulles d'air peuvent s'infiltrent sous la membrane ce qui peut gêner le contact entre les bactéries et le milieu nutritif.

Lorsque le bouillon de culture est ajusté au delà de la limite de rodage (Figure 8), l'inoculum ne s'infiltré pas au travers de la membrane en raison de la trop petite différence de niveau entre la colonne et la membrane.

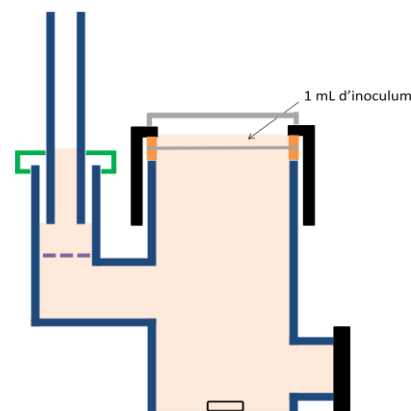


Figure 8 : MYG ajusté au delà de la limite de rodage

I.2. Déroulement des cinétiques

Le déroulement des cinétiques est présenté dans l'Annexe 4. Elles se passent en quatre temps qui sont : la préparation et la stérilisation du matériel, la préparation de l'inoculum, l'inoculation et l'incubation des dispositifs et les analyses réalisées.

I.2.a. Préparation et stérilisation du matériel

Les milieux de culture préparés sont : du MRS agar pour le dénombrement de *L. sakei*, du MYG afin de remplir les dispositifs, des tubes d'EPT (eau peptonée tamponnée) pour les dilutions et du PCA (Plate Count Agar) afin de vérifier la non-contamination du milieu MYG lors des manipulations.

Le matériel utilisé comprend : les dispositifs avec leur membrane, des billes en verre (utilisées dans le lavage des membranes avant les dénombrements), des cônes de 1 ml (pour réaliser les dilutions) et des coupelles et des spatules afin de préparer l'inoculum.

Les milieux de culture et le matériel sont stérilisés pendant 21 minutes à 121 °C.

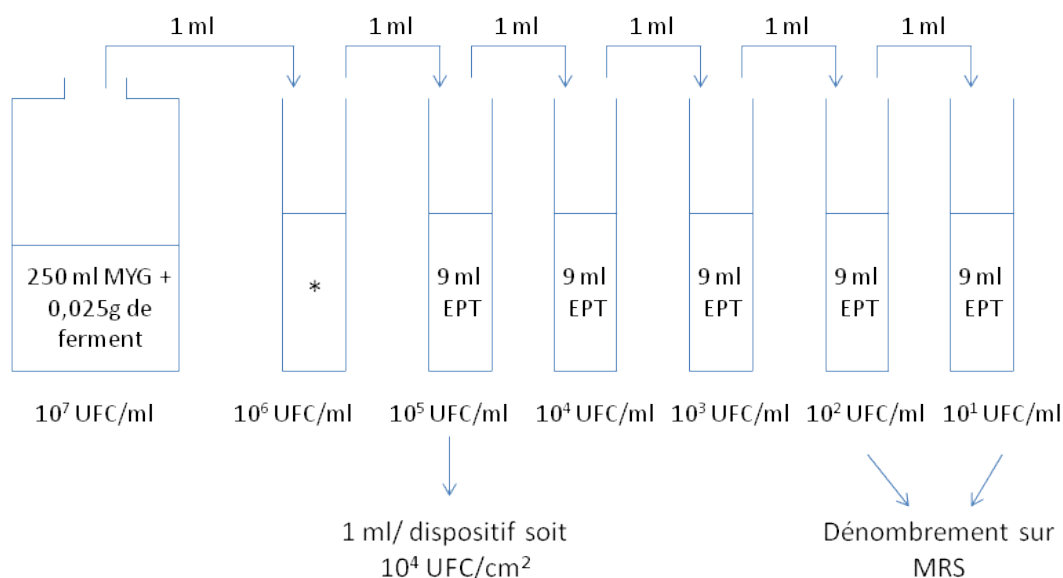
I.2.b. Préparation de l'inoculum

Pour que la durée de la phase de latence soit exclusivement due aux conditions rencontrées en dispositif, il est nécessaire de réaliser une pré-culture afin que les bactéries (ferment lyophilisé Danisco, France, Épernon) s'adaptent au milieu. Ainsi, la composition du milieu de la pré-culture est identique à celle du milieu MYG dit « de référence » (cf § III) : milieu MYG ajusté à pH 5,6 avec de l'acide chloridrique à 1 mol/l. Les bactéries sont prélevées après 3 h de pré-culture, en début de phase exponentielle de croissance.

Le ferment lyophilisé utilisé contient une charge initiale d'environ 10^{11} UFC/g : il est inoculé dans la pré-culture à hauteur de 10^7 UFC/ml. Après 3 h, il est dilué dans de l'EPT en se basant sur l'absorbance afin de préparer un inoculum dont la charge initiale est identique pour tous les essais (Figure 9).

Les dispositifs sont ainsiensemencés à hauteur de 10^4 UFC/cm² : cette valeur a été choisie car elle permet de bien évaluer la phase exponentielle de croissance : une population bactérienne initiale supérieure ne permettait pas d'évaluer correctement cette phase sachant que la saturation de la membrane se situe autour de 10^7 UFC/cm².

La pré-culture est dénombrée à chaque essai afin de s'assurer que la charge microbienne soit exacte, valeur qui conditionne le déroulement de la suite des essais en dispositif.



*Figure 9 : Préparation et dénombrement de l'inoculum de *L. sakei* à partir de la pré-culture*

* : Le volume d'eau peptonée à rajouter dans le tube de la première dilution est calculé en fonction de la charge microbienne de la pré-culture au bout de 3 h qui est estimée à partir de la mesure d'absorbance à 600 nm.

I.2.c. Inoculation et incubation des dispositifs

La membrane de chaque dispositif estensemencée avec 1 ml de la dilution -2 de la pré-culture pour obtenir une charge microbienne initiale de 10⁴ UFC/cm². Les dispositifs sont ensuite incubés sur une plaque d'agitation multiposte dans une enceinte climatique à 25 °C afin d'imiter les conditions tropicales de fabrication des produits carnés.

Le temps d'incubation des dispositifs varie en fonction de la cinétique réalisée. Toutes les cinétiques sont effectuées sur 24 h sauf si la phase exponentielle de croissance n'est pas terminée : dans ce cas des points supplémentaires sont réalisés au delà de cette limite de temps.

Les cinétiques sont réalisées avec le prélèvement d'un dispositif (membrane+bouillon) toutes les 3 h puis des points supplémentaires ont été réalisés à des heures spécifiques afin de mieux caractériser la courbe de croissance.

I.2.d. Prélèvement du milieu MYG et de la membrane

Suite à l'incubation des dispositifs et en condition stérile (sous hotte), le milieu du dispositif est vidé, en partie dans un tube pour la congélation, qui servira à réaliser des analyses à posteriori tandis que l'autre partie est transvasée dans un bécher pour la mesure du pH. La membrane est retirée du dispositif pour être dénombrée.

II. Analyses microbiologiques et physico-chimiques

II.1. Analyses microbiologiques

Trois types d'analyses microbiologiques sont réalisés : le dénombrement bactérien des membranes, la vérification de la non-contamination du bouillon de culture lors des manipulations et la validation de la méthode de décollement des bactéries de la membrane.

II.1.a. Dénombrement bactérien des membranes

Les membranes sont disposées dans un tube pour centrifugation contenant 10 ml d'EPT et des billes en verre. Une agitation pendant 1 min au vortex permet de décoller les bactéries de la membrane et d'obtenir la suspension mère utilisée pour le dénombrement.

La population microbienne est dénombrée après incubation à 30 °C pendant 48 h sur milieu MRS. Pour chaque échantillon, 4 dilutions décimales sont réalisées (Figure 10) et ensemencées (en masse) en triple.

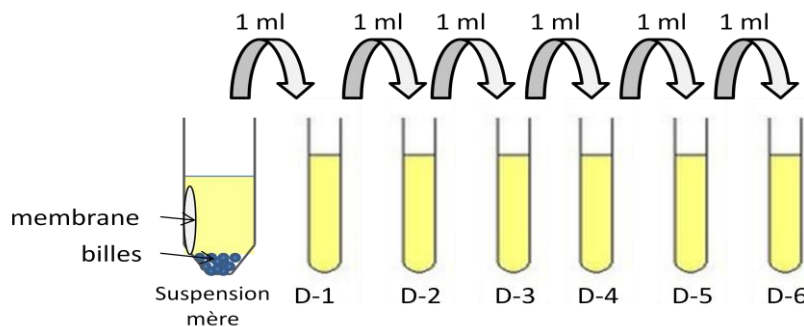


Figure 10 : Dilutions réalisées pour le dénombrement des membranes

Le choix des dilutions à ensemencer est déterminé en fonction de la mesure de l'absorbance (longueur d'onde : 600 nm) de la solution mère :

- si $A_{600\text{nm}} < 0,02$: ensemencement des dilutions -1, -2, -3 et -4 ;
- si $0,02 < A_{600\text{nm}} < 0,05$: ensemencement des dilutions -2, -3, -4 et -5 ;
- si $0,05 < A_{600\text{nm}} < 0,1$: ensemencement des dilutions -3, -4, -5 et -6 ;
- si $A_{600\text{nm}} > 0,1$: ensemencement des dilutions -4, -5 et -6.

A partir du dénombrement des boîtes, le nombre de bactéries par unité de surface sur la membrane est calculé selon la formule :

$$N(t) = \frac{X \times V}{\pi \times R^2}$$

$N(t)$ = nombre de bactéries par unité de surface à un instant t (UFC/cm²)

X = nombre de bactéries dans la suspension-mère (UFC/ml)

V = volume d'EPT de lavage de la membrane (10 ml)

R = rayon utile de la membrane (1,65 cm)

Deux courbes sont ensuite tracées :

- le nombre de bactéries lactiques $N(t)$ (UFC/cm²) en fonction du temps ;
- $\ln(N(t)/N_0)$ en fonction du temps : cette transformation est utilisée pour la phase exponentielle de croissance lorsque $\ln(N(t)/N_0)$ en fonction du temps est une droite dont l'équation est de la forme :

$$\ln \left(\frac{N(t)}{N_0} \right) = \mu_{max} t + cste$$

$N(t)$ = nombre de bactéries par unité de surface à un instant t (UFC/cm²)

N_0 = nombre de bactéries par unité de surface à l'instant $t=0$ (UFC/cm²)

μ_{max} = vitesse spécifique de croissance (h⁻¹)

t = temps (h)

Cette équation permet de déterminer μ_{max} , le temps de génération cellulaire ($G = \frac{\ln 2}{\mu_{max}}$) et la durée de la phase de latence pour laquelle ($\ln \left(\frac{N(t)}{N_0} \right) = 0$).

II.1.b. Efficacité du décollement des bactéries de la membrane

Les membranes d'un essai (essai de référence « REF » cf § III) ont été prélevées à 0 et 24 h, passées au vortex puis déposées dans des boîtes de Pétri contenant du milieu MRS afin de savoir si la technique de décollement des bactéries était efficace. Trois répétitions ont été effectuées dans les deux cas.

II.1.c. Contamination du milieu MYG

Afin de déterminer la contamination de la flore non-lactique lors des manipulations, du milieu MYG est introduit dans des dispositifs, puis retiré à $t=0$ h et à $t=48$ h d'incubation pour être ensemencé sur les milieux PCA et MRS. La gélose PCA est un milieu nutritif, ne contenant pas d'inhibiteur, utilisé pour le dénombrement de la flore totale aérobie mésophile.

Afin d'obtenir le niveau de contamination du bouillon de culture par la manipulation, $N_{contamination}$ (UFC/ml), le nombre de micro-organismes présents initialement sur milieu PCA et le nombre de bactéries lactiques présentes à $t=48$ h sur milieu MRS sont soustraits au nombre de micro-organismes présents sur PCA au bout de 48 h.

$$N_{contamination} = N_{PCA \text{ à } 48h} - N_{MRS \text{ à } 48h} - N_{PCA \text{ à } 0h}$$

II.2. Analyses physico-chimiques

II.2.a. Mesure du pH

Le pH du milieu MYG est mesuré à l'aide d'un titrateur automatique (SCHOTT Instruments, Allemagne, Mainz). A partir des résultats obtenus, les courbes d'évolution du pH sont tracées au cours du temps.

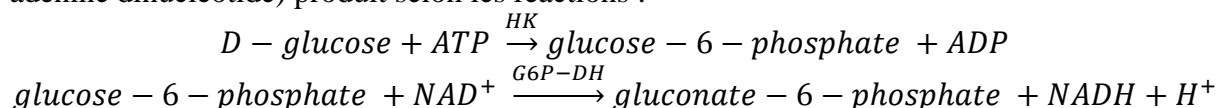
II.2.b. Mesure de l'activité de l'eau

L' a_w du milieu MYG est mesurée à l'aide d'un Awmètre (FA-st/1, GBX, France, Romans) à $25 \pm 0,1$ °C. L'appareil est préalablement calibré avec une solution aqueuse saturée en NaCl dont l' $a_w=0,753$. Chaque mesure est doublée.

II.2.c. Dosage du D-glucose

Le dosage du D-glucose du milieu MYG est réalisé avec le kit ENZYTECTM fluid 5140 (SCIL Diagnostics, Allemagne, Viernheim) selon le protocole préconisé par le fournisseur. Le

dosage du glucose se fait par spectrophotométrie à 340 nm en dosant le NADH (nicotinamide adénine dinucléotide) produit selon les réactions :



Le D-glucose est phosphorylé par l'enzyme hexokinase (HK) et l'adénosine triphosphate (ATP) en glucose-6-phosphate, avec formation simultanée d'adénosine diphosphate (ADP).

En présence de l'enzyme glucose-6-phosphate déshydrogénase (G6P-DH), le glucose-6-phosphate est oxydé par le nicotinamide-adénine dinucléotide (NAD^+) en gluconate-6-phosphate, avec formation de NADH.

La quantité de NADH formée au cours de cette réaction est stœchiométrique avec la quantité de D-glucose.

La concentration en glucose se calcule selon la formule suivante :

$$C_{D-glucose} = \frac{V \times M \times \Delta A}{\varepsilon \times d \times v \times 1000}$$

$C_{glucose}$ = concentration en glucose (g/l)

V = volume total de réactifs dans la cuve de mesure (μl)

M = masse moléculaire du D-glucose (g/mol)

ΔA = variation d'absorbance entre un blanc et l'échantillon (-)

d = largeur de la cuve de mesure (cm)

v = volume d'échantillon (μl)

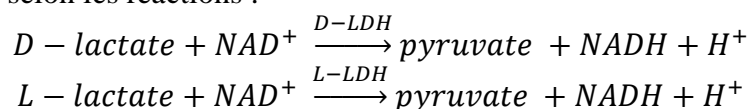
ε = coefficient d'extinction molaire (l/mol⁻¹/cm⁻¹)

La limite inférieure de détection de la concentration en glucose est de 4,1 mg/l.

Ce dosage est réalisé à posteriori à partir des milieux congelés.

II.2.d. Dosage du D-lactate et du L-lactate

Le dosage de l'acide lactique du milieu MYG est réalisé avec le kit ENZYTECTM fluid 5240 (SCIL Diagnostics, Allemagne, Viernheim) pour l'acide D-lactique et le kit ENZYTECTM fluid 5260 (SCIL Diagnostics) pour l'acide L-lactique selon le protocole préconisé par le fournisseur. Le dosage de l'acide lactique se fait par spectrophotométrie à 340 nm en dosant le NADH produit selon les réactions :



En présence de NAD^+ (nicotinamide adénine dinucléotide), l'acide lactique est oxydé en pyruvate par la D-LDH (D-lactate déshydrogénase) ou la L-LDH selon le dosage réalisé. La formation de NADH, mesurée par l'augmentation de l'absorbance à 340 nm, est proportionnelle à la quantité de D-Lactate ou de L-Lactate présente dans l'échantillon.

La concentration en acide lactique du milieu de culture est calculée avec la formule suivante :

$$C_{lactate} = \frac{V \times M \times \Delta A}{\varepsilon \times d \times v \times 1000}$$

C_{lactate} = concentration en lactate (g/l)
 V = volume total de réactifs dans la cuve de mesure (μl)
 M = masse molaire acide lactique (g/mol)
 ΔA = variation d'absorbance entre un blanc et l'échantillon (-)
 d = largeur de la cuvette de mesure (cm)
 v = volume d'échantillon (μl)
 ε = coefficient d'extinction molaire ($\text{l}/\text{mol}^1/\text{cm}^1$)

La limite inférieure de détection du kit est de 1,2 mg/l

Ce dosage est réalisé à posteriori à partir des milieux congelés.

Les analyses microbiologiques et physico-chimiques ont été réalisées pour un ensemble d'essais avec divers bouillons de culture formulés en fonction du plan d'expériences suivant.

III. Plan d'expériences

Le milieu de culture MYG est formulé en fonction des quatre paramètres suivant :

- l'activité de l'eau (a_w)
- la teneur en sel
- le pH
- la teneur en acide lactique non-dissocié (AH)

Le Tableau 1 résume les essais réalisés.

Tableau 1: Plan d'expériences

Essais	Aw	Teneur en sel (% p/v)	PH	Teneur en AH (% p/v)
REF	1	0	5,6	0
Aw	Varie	0	5,6	0
NaCl	f(NaCl)	Varie	5,6	0
PH	1	0	Varie	0
AH	1	0	4,7	Varie

• **REF** : l'essai de référence (REF) a été préparé afin d'avoir un essai de croissance optimal dans le domaine d'étude qui pourra être comparé aux autres essais dans lesquels l'activité en eau, la teneur en sel, le pH et la teneur en acide lactique non-dissocié varient.

La valeur du pH choisie pour l'essai de référence (5,6) correspond au pH moyen des viandes post-mortem (Durand, 1999a).

• **Aw** : l'essai « Aw » correspond à l'essai où l'activité de l'eau varie. Plusieurs cinétiques sont réalisées dont la recherche de l' a_w minimale pour laquelle une croissance microbienne est observée. L' a_w est ajustée à l'aide de glycérol pur : une courbe étalon a été réalisée au préalable afin de connaître la quantité de glycérol à rajouter dans le bouillon de culture en fonction de l'activité en eau désirée (Annexe 5).

• **NaCl** : l'essai « NaCl » correspond à l'expérience où la teneur en sel du milieu MYG varie. Plusieurs cinétiques sont réalisées dont la recherche de la teneur en sel maximale qui permet une croissance chez *L. sakei*. La teneur en sel est couplée à l' a_w . En effet, le sel étant un agent dépresseur de l'activité de l'eau, son ajout dans le milieu diminue donc

obligatoirement l' a_w . De ce fait, le choix des valeurs à réaliser dans les essais « Aw » et « NaCl » seront liées. Les courbes des essais « NaCl », n'ayant pas une a_w de 1, ne pourront pas être comparées seulement avec la référence, elles seront aussi comparées avec des courbes ayant la même a_w mais abaissées avec du glycérol (essais « Aw »).

- PH : l'essai « PH » correspond à l'expérience où le pH varie par ajout d'acide chlorhydrique à 1 mol/l.

- AH : L'essai « AH » correspond à l'expérience où la teneur en acide lactique non-dissocié varie. Le pourcentage de dissociation étant fonction du pH et étant de 0 % p/v à pH=5,6, il a été choisi la valeur de pH 4,7 qui représente la valeur moyenne rencontrée dans les produits fermentés (Santchurn et al., 2011). A cette valeur de pH la présence d'AH sera maximale. Une courbe étalon a été réalisée au préalable afin de connaître la quantité d'acide lactique à rajouter dans le milieu MYG, afin d'obtenir la concentration désirée en acide lactique non-dissocié une fois le milieu ajusté à pH 4,7 avec du NaOH (hydroxyde de sodium) à 5 mol/l (Annexe 6).

PRÉSENTATION DES RÉSULTATS

I. Validation du dispositif

Avant de réaliser les essais du plan d'expériences, le fonctionnement du dispositif a été validé en vérifiant :

- la non-contamination du milieu MYG ;
- l'efficacité du décollement des bactéries de la membrane lors de leur dénombrement ;
- la condition non-limitante du milieu MYG lors de l'essai de référence ;
- la répétabilité des manipulations (essai de référence) ;

I.1. Non-contamination du milieu MYG

Le Tableau 2 présente les résultats des dénombrements de milieux MYG introduits dans le dispositif et récupérés après inoculation de la membrane et incubation à 0 h et 48 h.

Tableau 2 : Dénombrements du milieu MYG

Durée d'incubation du milieu (h)	n	PCA (UFC/ml)	MRS (UFC/ml)
0	3	< 10	< 10
48	3	$9,4.10^2$ ($3,0.10^2$)	$1,7.10^2$ ($2,9.10^1$)

Les résultats sont présentés sous la forme : moyenne (écart-type); n=nombre de répétitions

A t=0 h (Tableau 2), la dilution 0 en milieu PCA contient moins de 10 colonies/ml, ce qui signifie que le milieu MYG n'est pas contaminé par la manipulation de remplissage. Il en est de même en milieu MRS ce qui montre que les bactéries ne traversent pas la membrane.

Au bout de 48 h, le nombre de micro-organismes présents dans le milieu MYG a augmenté :

- le dénombrement sur PCA a révélé une flore moyenne de $9,4.10^2$ ($3,10^2$) UFC/ml ;
- le dénombrement sur MRS a révélé une flore lactique à hauteur de $1,7.10^2$ ($2,9.10^1$) UFC/ml. Il semblerait donc qu'une petite partie des bactéries traverse la membrane au cours de l'incubation. Cependant, cette valeur reste acceptable étant donné le développement important qui a lieu sur la membrane au cours de la cinétique (jusqu'à 10^7 UFC/cm²).

La contamination du bouillon de culture est de $7,6.10^2$ UFC/ml. Cette faible valeur indique que le milieu MYG n'est pas contaminé durant les cinétiques.

Cette vérification permet de valider l'efficacité de la technique de stérilisation et la réalisation des manipulations lors de l'inoculation et du remplissage des dispositifs. Les futurs essais pourront donc être exécutés sans crainte que des flores concurrentielles se développent sur la membrane et/ou dans le bouillon de culture lors de l'incubation des dispositifs.

I.2. Efficacité du décollement des bactéries de la membrane lors de leur dénombrement

En posant les membranes d'un essai de référence récupérées après 0 h et 24 h d'incubation sur des boîtes MRS, aucune bactérie lactique n'a poussé. La technique utilisée (EPT + billes en verre + vortex 1 min) pour décoller les bactéries de la membrane est efficace : toutes les bactéries présentes sur la membrane se retrouvent dans la solution mère et sont donc dénombrées.

I.3. Milieu infini et non-limitant

Les évolutions du pH et des concentrations en glucose et en acides D et L-lactiques du milieu MYG pour l'essai de référence sont présentées dans la Figure 11 et le Tableau 3.

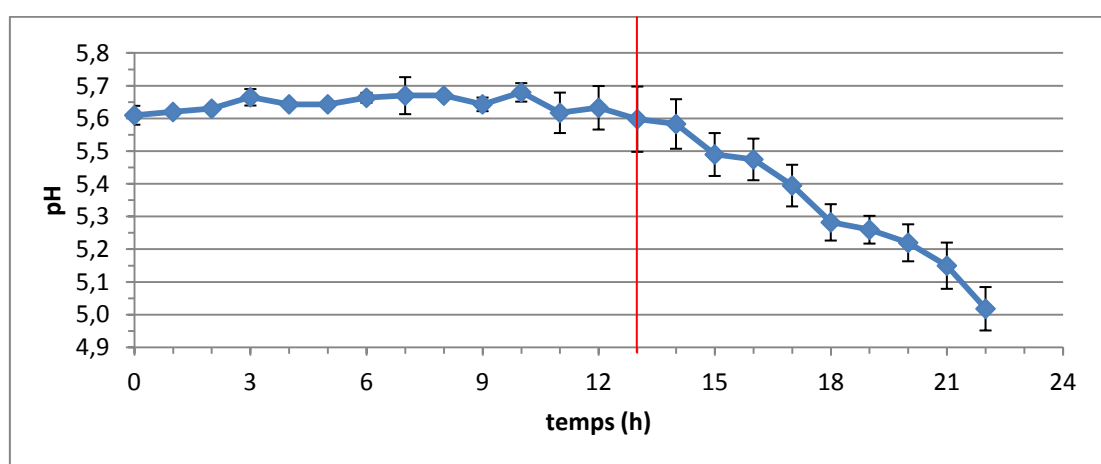


Figure 11 : Evolution du pH du milieu MYG en fonction du temps pour l'essai de référence

Le pH se maintient à la valeur initiale de 5,6 pendant 13 h puis diminue pour atteindre 5,0 (0,07) au bout de 24 h (Figure 11).

Tableau 3 : Evolution des concentrations en D-glucose et en acide lactique du milieu MYG pour l'essai de référence

Échantillon	n	D-glucose (g/l)	Acide D-lactique (g/l)	Acide L-lactique (g/l)
0 h	3	4,35 (0,28)	0,02 (0,01)	0,04 (0,02)
12 h	3	4,70 (0,29)	0,02 (0,01)	0,07 (0,03)
24 h	3	4,24 (0,02)	0,03 (0,01)	0,37 (0,02)

Les résultats sont présentés sous la forme : moyenne (écart-type); n=nombre de répétitions.

La quantité de glucose initialement présente dans le milieu de culture, en théorie de 5 g/L, est de 4,35 (0,28) g/l à 0 h (Tableau 3). Cet écart peut s'expliquer par une légère réaction de Maillard pendant le processus de stérilisation du milieu de culture.

A 24 h, la concentration en glucose est de 4,24 (0,02) g/l ce qui n'est pas significativement différent de la concentration initiale. Elle reste donc non-limitante et égale aux conditions initiales tout au long de la cinétique.

La production de D-lactate est minime tout au long de la cinétique avec une concentration présente dans le milieu qui reste inférieure à 0,05 g/L (Tableau 3). La production de L-lactate, quant à elle, reste faible jusqu'à 12 h puis augmente à 0,37 (0,02) g/L au bout de 24 h.

Le dispositif fonctionne donc comme un milieu infini et non-limitant pendant 13 h dans le cas de l'essai de référence. Après cette période la production de L-lactate devient importante vis-à-vis du volume du dispositif (100 ml) et abaisse le pH du milieu de culture, ce qui peut induire des modifications de la croissance bactérienne. De ce fait, il est important que la phase exponentielle et le début de la phase stationnaire soient contenus dans les 13 h pendant lesquelles le milieu MYG peut être considéré comme infini afin de caractériser précisément les impacts sur la croissance des facteurs étudiés à leurs valeurs initiales.

L'essai de référence étant l'essai pour lequel la croissance bactérienne est la plus élevée (conditions optimales du plan d'expériences), il est possible de supposer que les variations de concentration en glucose et en acide lactique seront inférieures dans le cas des autres essais et qu'il est donc inutile de les suivre. Cependant, afin de s'assurer que les paramètres de croissance identifiés le seront lorsque le dispositif fonctionne en conditions non-limitantes et infinies, le pH du milieu MYG a été suivi dans tous les essais réalisés.

I.4. Répétabilité des résultats obtenus

La Figure 12 présente la courbe de croissance bactérienne obtenue pour l'essai de référence ($a_w=1$, $T_{sel}=0$ % p/v, pH=5,6, $T_{AH}=0$ % p/v).

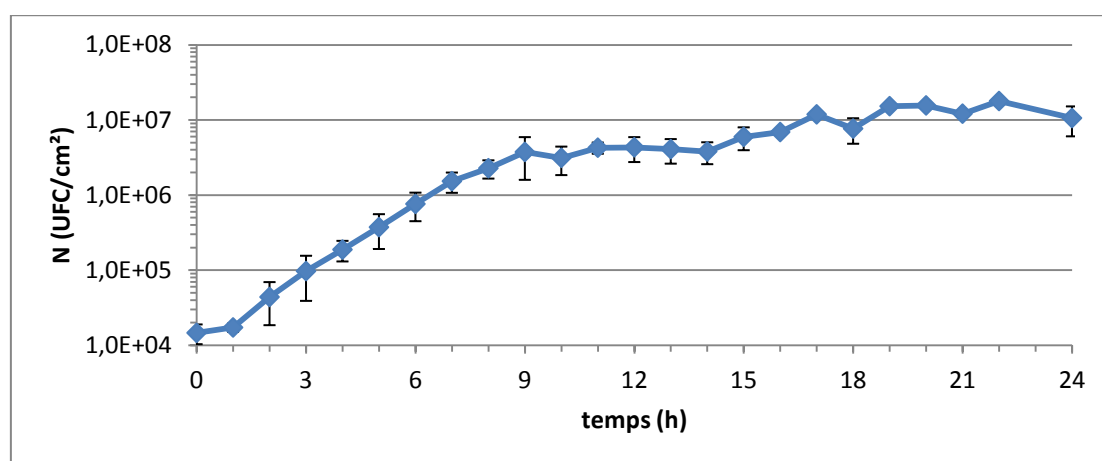


Figure 12 : Croissance de *L. sakei* en dispositif (essai de référence)

Au vu des valeurs des écart-types obtenus (inférieurs à 5 %) pour les courbes du pH du milieu MYG en fonction du temps (Figure 11) et de la croissance bactérienne (Figure 12), les résultats sont répétables d'un essai à l'autre, ce qui valide l'efficacité de l'ensemble de la manipulation sur dispositif.

La courbe de croissance bactérienne permet d'identifier la phase de latence, la phase exponentielle de croissance et une partie de la phase stationnaire en 24 h (Figure 12). La durée de la phase de latence couplée à la phase de croissance exponentielle est de 9 h. Ces deux phases peuvent donc être étudiées dans la période où le milieu est considéré comme infini et non-limitant. La phase stationnaire est induite au bout de 9 h et dure jusqu'à $t=14$ h. Après cette première phase stationnaire, où l'on atteint une population de $4,3 \cdot 10^6$ ($1,6 \cdot 10^6$) UFC/cm², la croissance de *Lactobacillus sakei* repart jusqu'à $t=20$ h pour atteindre $1,6 \cdot 10^7$ ($2,5 \cdot 10^6$) UFC/cm² et repasser en phase stationnaire.

La phase de déclin n'a pas été identifiée car elle n'est pas intéressante dans le cadre de cette étude.

La caractérisation de la phase exponentielle de croissance permet de déterminer μ_{\max} , λ et G dans les conditions optimales de croissance du plan d'expériences (Figure 13) :

- R^2 est proche de 1 ce qui signifie que la régression linéaire est de bonne qualité : les résultats peuvent donc être interprétés à partir de cette droite ;
- la durée de la phase de latence, λ , est de 21 minutes : en théorie, elle aurait dû être nulle car la pré-culture est réalisée dans les mêmes conditions que l'essai de référence afin de s'affranchir de la phase de latence. Cette petite phase de latence pourrait s'expliquer dans un premier temps par le fait que la pré-culture est inoculée, lorsqu'elle se trouve en début de phase exponentielle de croissance et qu'idéalement il aurait fallu l'inoculer en milieu de phase exponentielle. Il est aussi possible que le passage dans l'EPT pour préparer l'inoculum ait légèrement perturbé le métabolisme bactérien. Enfin le passage du milieu liquide de la pré-culture vers la surface de la membrane pourrait aussi nécessiter un temps d'adaptation minimal, toutes les conditions étant égales par ailleurs.
- la vitesse spécifique de croissance, μ_{\max} , est de $0,67 \text{ h}^{-1}$: la population bactérienne croît de 0,67 unité par heure ;
- le temps de génération cellulaire, G, est de 62 min ce qui signifie que 62 minutes sont nécessaires pour doubler la population bactérienne.

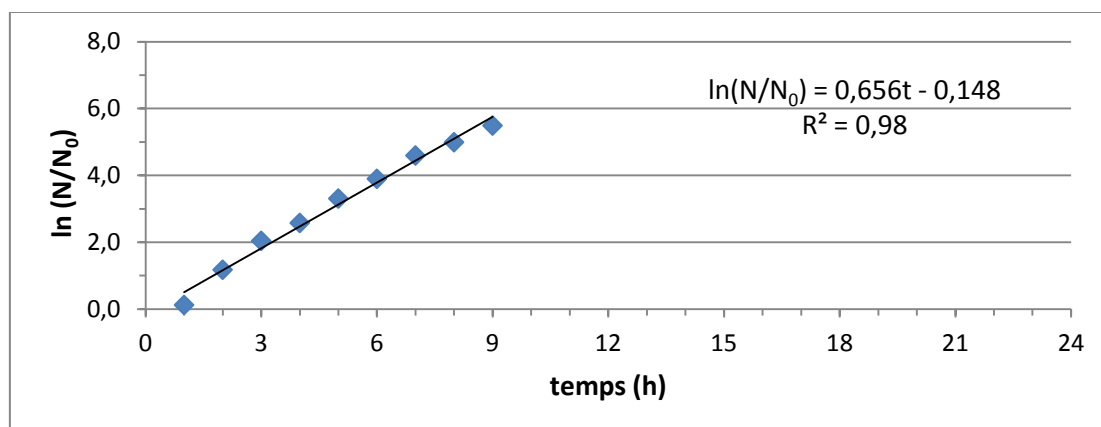


Figure 13 : $\ln(N/N_0)$ en fonction du temps lors de la phase exponentielle de croissance (essai de référence)

Les divers essais du plan d'expériences peuvent donc être réalisés en sachant que les conditions du milieu de culture seront respectées, que les résultats seront répétables et les courbes obtenues de bonne qualité.

II. Plan d'expériences

Pour chaque paramètre étudié, dans le cadre du plan d'expériences réalisé, les courbes de croissance de *L. sakei* et l'évolution du pH en fonction du temps seront présentées.

II.1. Croissances microbiennes lors des essais réalisés

II.1.a. Essais « Aw »

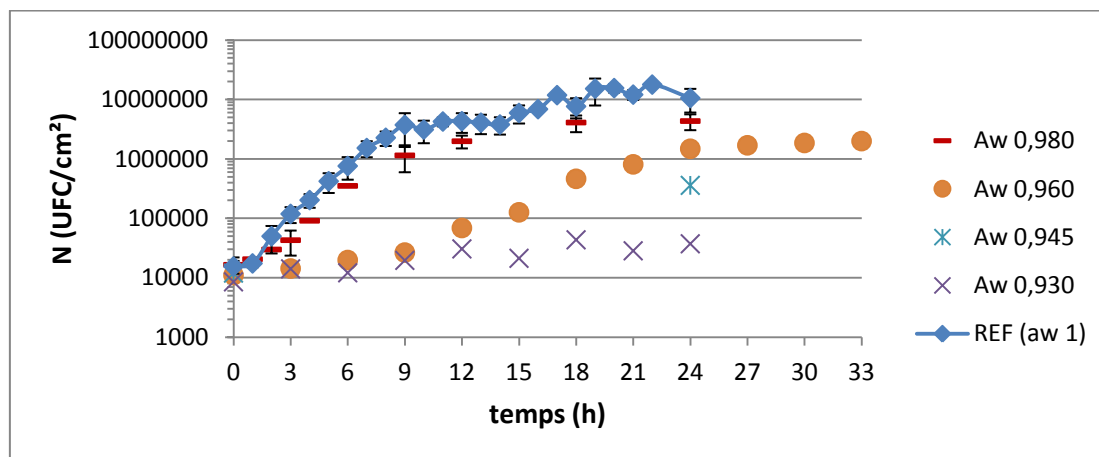
Pour les essais « Aw », des cinétiques ont été réalisées avec 4 niveaux d'activité en eau compris entre 0,93 et 1 (Tableau 4). 0,93 correspond à l' a_w de la solution de DII la plus

concentrée en solutés dans les travaux sur filets de viande menés par Bros et al. (2012). L' a_w à la surface des filets ne pourra être que supérieure ou égale à cette valeur.

Tableau 4 : Plan d'expériences pour les essais « A_w »

Essais	A_w	Teneur en sel (% p/v)	PH	Teneur en AH (% p/v)
REF	1	0	5,6	0
A_w	0,930 ; 0,945 ; 0,960 ; 0,980	0	5,6	0

Pour chaque essai, la population microbienne a été évaluée en fonction du temps (Figure 14).



*Figure 14 : Croissance de *L. sakei* en dispositif (essais « A_w »)*

Lorsque l' a_w est de 0,945, une légère croissance bactérienne est visible ($n=3$ mais les barres d'erreurs ne sont pas visibles sur le graphique). Pour une a_w de 0,93 aucune croissance n'a lieu : les bactéries se maintiennent en vie mais la population n'augmente pas. L' a_w limite de croissance de *L. sakei* se situe donc entre 0,93 et 0,945.

Pour une a_w de 0,98, la croissance microbienne est inférieure à celle de la référence : cependant après une phase de latence plus longue et une vitesse de croissance plus lente, la population bactérienne rejoint celle de la référence au bout de 24 h ($4,3 \cdot 10^6$ ($1,3 \cdot 10^6$) UFC/cm² pour l'essai « A_w 0,98 » et $1,1 \cdot 10^7$ ($4,5 \cdot 10^6$) UFC/cm² pour l'essai « REF »).

Pour une a_w de 0,96, la croissance est visiblement perturbée : la phase de latence augmente, μ_{\max} diminue et le nombre de bactéries présentes sur la membrane au bout de 24 h reste inférieur à celui de la cinétique « A_w 0,98 ».

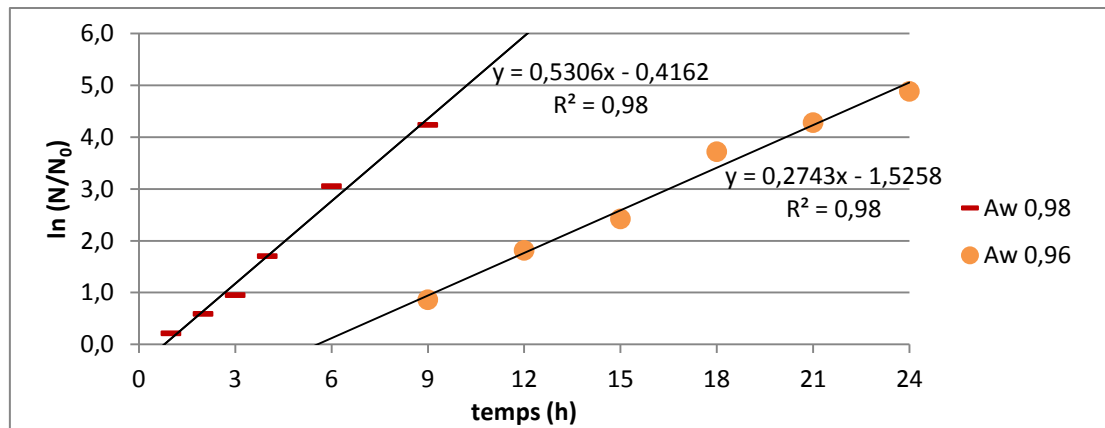


Figure 15 : $\ln(N/N_0)$ en fonction du temps lors de la phase exponentielle de croissance de *L. sakei* (essais « Aw »)

Pour l'essai « Aw 0,98 » (Figure 15), μ_{\max} est de $0,53 \text{ h}^{-1}$ tandis que la phase de latence est de 47 minutes et le temps de génération cellulaire est de 1h30.

Pour une a_w de 0,96 la phase de latence est plus longue : 5h30 est nécessaire aux bactéries afin de s'adapter au milieu de culture. De même que la phase de latence augmente, μ_{\max} ($0,27 \text{ h}^{-1}$) diminue et G (3 h) s'accroît.

II.1.b. Essais « NaCl »

Pour les essais « NaCl », des cinétiques ont été réalisées avec 3 concentrations en sel différentes comprises entre 0 et 7 % p/v (Tableau 5).

Tableau 5 : Plan d'expériences pour l'essai « NaCl »

Essais	Aw	Teneur en sel (% p/v)	PH	Teneur en AH (% p/v)
REF	1	0	5,6	0
NaCl	$f(\text{NaCl})$	4 ; 6 ; 7	5,6	0

Pour chaque essai, la population microbienne a été évaluée en fonction du temps (Figure 16).

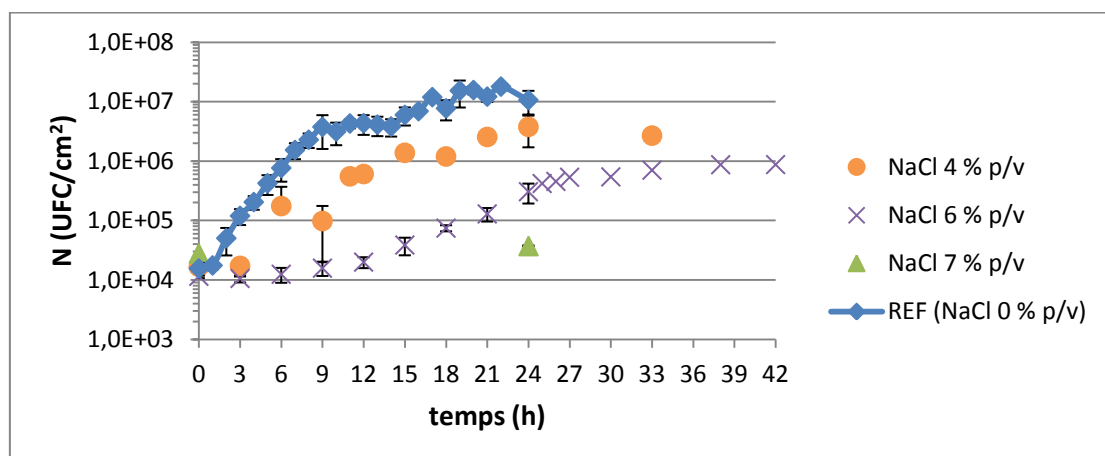


Figure 16 : Croissance de *L. sakei* en dispositif (essais « NaCl »)

Lorsque la concentration en sel est de 7 % p/v, aucune croissance n'a lieu ($n=3$ mais les barres d'erreurs ne sont pas visibles sur le graphique) : les bactéries se maintiennent en vie mais la

population n'augmente pas. A 6 % p/v, une croissance est observée. La concentration en NaCl limite de croissance de *L. sakei* se situe donc entre 7 et 6 % p/v.

Pour une concentration en sel de 4 % p/v, la croissance microbienne est plus lente que pour l'essai « REF ». Cependant après une phase de latence plus longue et une vitesse de croissance plus lente, la population bactérienne se rapproche de celle de la référence au bout de 24 h ($3,8 \cdot 10^6$ ($2,1 \cdot 10^6$) UFC/cm² pour l'essai « NaCl 4 % p/v » et $1,10^7$ UFC/cm² ($4,5 \cdot 10^6$) pour l'essai « REF »).

Pour une concentration en sel de 6 % p/v, la croissance est visiblement perturbée : la phase de latence augmente, μ_{\max} diminue et le nombre de bactéries présentes sur la membrane au bout de 24 h reste inférieur à celui de la cinétique « REF ».

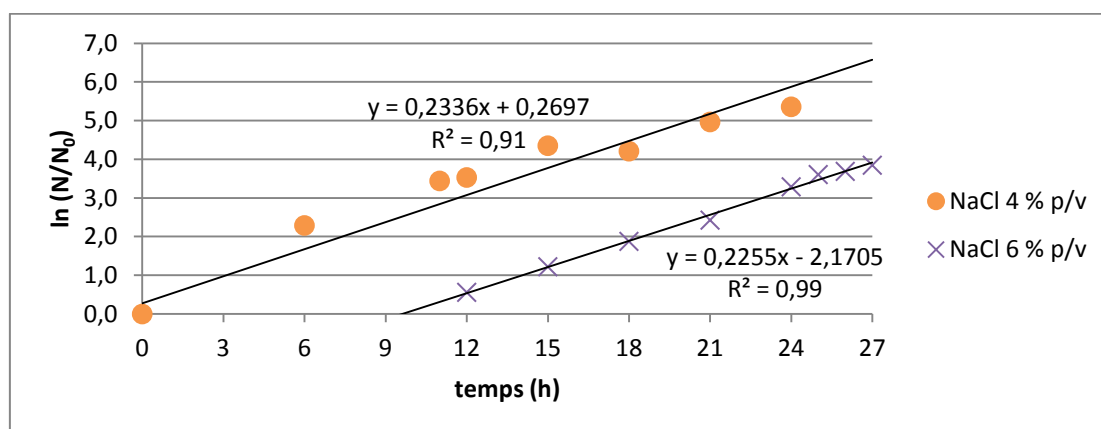


Figure 17 : $\ln(N/N_0)$ en fonction du temps lors de la phase exponentielle de croissance de *L. sakei* (essais « NaCl »)

Pour l'essai « NaCl 4 % p/v » (Figure 17), μ_{\max} est de $0,23 \text{ h}^{-1}$ tandis que le temps de génération cellulaire est de 1h30. Pour cette cinétique, la phase de latence n'a pas pu être déterminée dû au manque de valeurs obtenues (des points intermédiaires auraient été nécessaires) ; cependant elle peut être estimée à 3 h environ au vu de la courbe de croissance (Figure 16).

Pour l'essai « NaCl 6 % p/v » la phase de latence est plus longue : 9h45 est nécessaire aux bactéries afin qu'elles s'adaptent au milieu de culture. Par contre, μ_{\max} et G sont identiques à l'essai « NaCl 4 % p/v ».

D'après les résultats obtenus en milieu liquide, le μ_{\max} de l'essai « NaCl 4 % p/v » aurait dû être supérieur à celui de l'essai « NaCl 6 % p/v ». De plus une modélisation des résultats, réalisée dans le cadre de la thèse encadrant ce stage a montré que le μ_{\max} de « NaCl 4 % p/v » était de $0,38 \text{ h}^{-1}$ tandis que celui de « NaCl 6 % p/v » était de $0,25 \text{ h}^{-1}$.

II.1.c. Essais « PH »

Pour les essais « PH », des cinétiques ont été réalisées en fonction de 3 pH différents compris entre 5,6 et 4,0 (Tableau 6).

Tableau 6 : Plan d'expériences pour les essais « PH »

Essais	A _w	Teneur en sel (% p/v)	PH	Teneur en AH (% p/v)
REF	1	0	5,6	0
PH	1	0	4,0 ; 4,1 ; 4,7	0

Pour chaque essai, la population microbienne a été évaluée en fonction du temps (Figure 17).

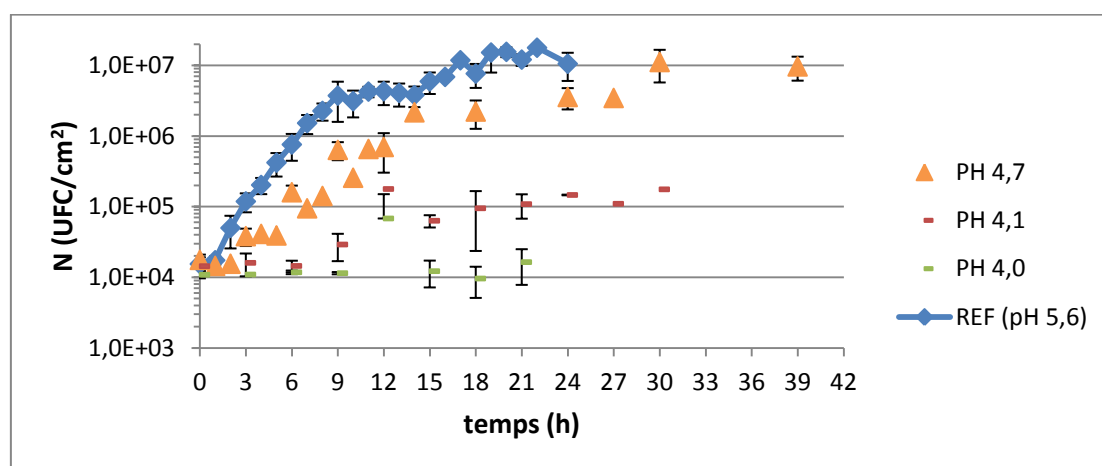


Figure 18 : Croissance de *L. sakei* en dispositif (essais « PH »)

Pour un pH de 4,1, la croissance est faible : au bout de 24 h, *L. sakei* n'a crû que de $1,0 \cdot 10^5$ UFC/cm². Lorsque le pH est de 4,0, aucune croissance n'a lieu : les bactéries se maintiennent en vie mais ne se reproduisent pas. La limite de pH de croissance de *L. sakei* se situe donc entre 4,0 et 4,1.

Pour un pH de 4,7, la croissance microbienne est plus lente que pour l'essai « REF » : cependant au bout de 14 h les populations bactériennes sont quasiment identiques ($2,2 \cdot 10^6$ UFC/cm² pour l'essai « PH 4,7 » et $3,8 \cdot 10^6$ ($1,2 \cdot 10^6$) UFC/cm² pour l'essai « REF »). A t=27 h, *L. sakei*, après une phase stationnaire de 13 h, reprend sa croissance pour atteindre à t=30 h la même population microbienne ($1,1 \cdot 10^7$ ($4,5 \cdot 10^6$) UFC/cm²) que l'essai « REF ».

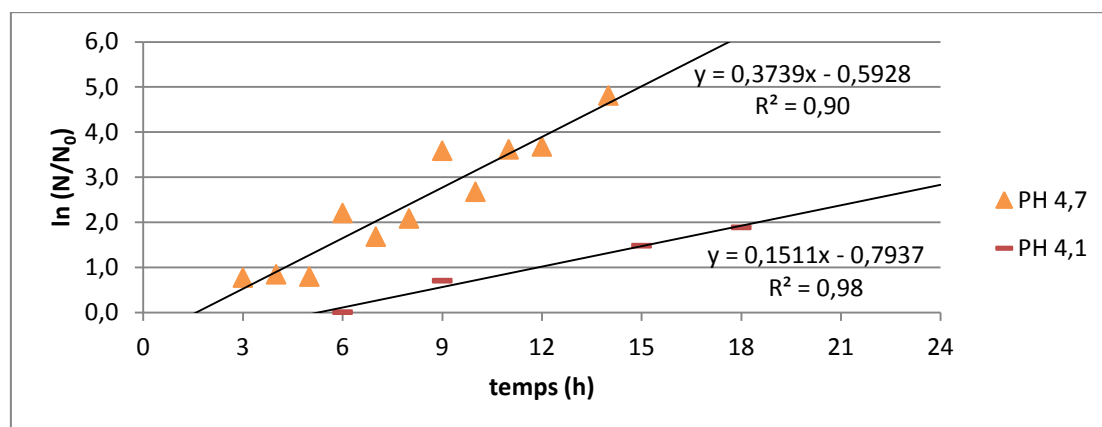


Figure 19 : $\ln (N/N_0)$ en fonction du temps lors de la phase exponentielle de croissance de *L. sakei* (essais « pH »)

Pour l'essai « PH 4,7 » (Figure 19), μ_{\max} est de $0,37 \text{ h}^{-1}$ tandis que la phase de latence est de 2h45 et le temps de génération cellulaire est de 2 h.

Pour un pH de 4,1, la phase de latence est plus longue : 5h30 est nécessaire aux bactéries afin qu'elles s'adaptent au milieu de culture. De même que la phase de latence augmente, μ_{\max} ($0,15 \text{ h}^{-1}$) diminue et G (5 h) augmente.

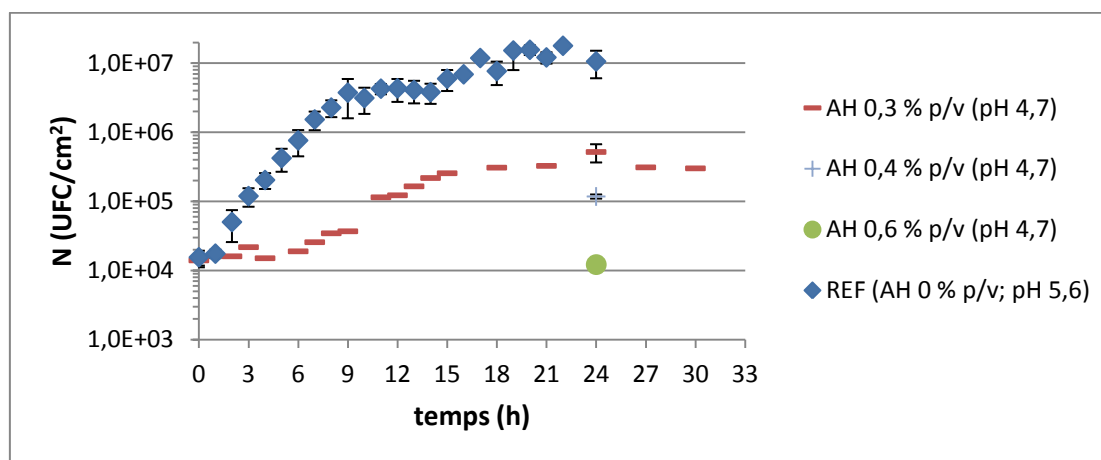
II.1.d. Essais « AH »

Pour les essais « AH », des cinétiques ont été réalisées avec 3 teneurs en acide lactique non-dissocié différentes comprises entre 0 et 0,6 % p/v (Tableau 7).

Tableau 7 : Plan d'expériences pour les essais « AH »

Essais	Aw	Teneur en sel (% p/v)	PH	Teneur en AH (% p/v)
REF	1	0	5,6	0
AH	1	0	4,7	0,3 ; 0,4 ; 0,6

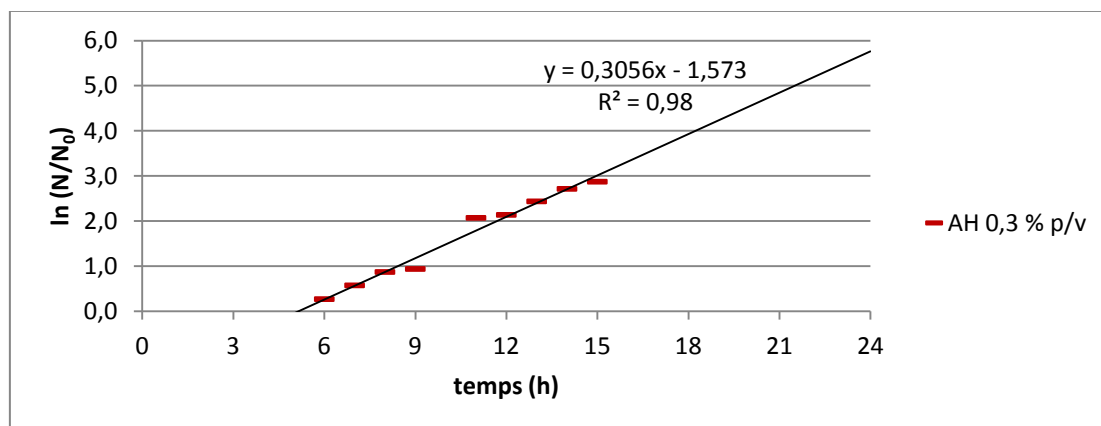
Pour chaque essai, la population microbienne a été évaluée en fonction du temps (Figure 20).



*Figure 20 : Croissance de *L. sakei* en dispositif (essais «AH»)*

Pour la cinétique « AH 0,4 % p/v », une croissance bactérienne est visible. Lorsque la quantité d'acide lactique non-dissocié augmente à 0,6 % p/v, aucune croissance n'est visible ($n=3$ mais les barres d'erreurs ne sont pas visibles sur le graphique) : les bactéries se maintiennent en vie mais la population n'augmente pas. Le seuil limite de croissance de *L. sakei* se situe donc entre 0,4 et 0,6 % p/v d'acide lactique non-dissocié.

Pour une concentration en AH de 0,3 % p/v, la croissance est ralentie comparé à la courbe « REF » : la phase de latence augmente, μ_{\max} diminue et le nombre de bactéries présent sur la membrane au bout de 24 h est plus faible.



*Figure 21 : $\ln(N/N_0)$ en fonction du temps lors de la phase exponentielle de croissance de *L. sakei* (essais « AH »)*

Pour l'essai « AH 0,3 % p/v » (Figure 21), μ_{\max} est de $0,31 \text{ h}^{-1}$ tandis que la phase de latence est de 5h15 et le temps de génération cellulaire est de 2h30.

II.2. Evolution du pH du milieu MYG contenu dans le dispositif lors des essais réalisés

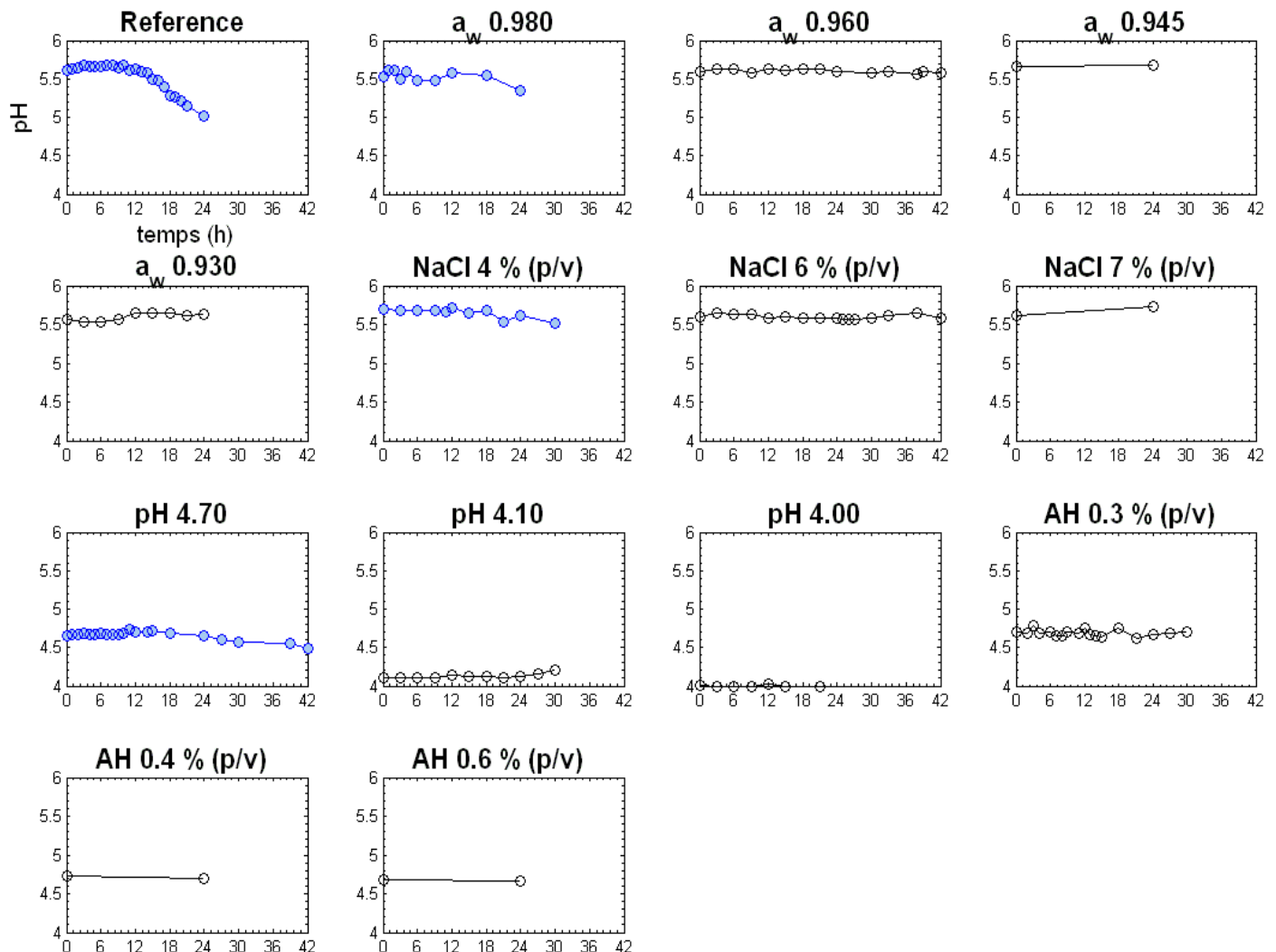


Figure 22 : Evolution du pH en fonction du temps pour chaque essai réalisé

Pour la majorité des essais le pH reste stable alors qu'il diminue au cours de la cinétique pour 3 essais (Figure 22) :

- pour l'essai « PH 4,7 », le pH diminue au bout de 24 h ;
- pour l'essai « NaCl 4 % p/v », le pH diminue au bout de 24 h ;
- pour l'essai « Aw 0,98 », le pH diminue au bout de 18 h.

Concernant ces trois essais, la production d'acide lactique devient suffisante pour abaisser le pH du milieu de culture. Le dispositif fonctionne comme un milieu infini pendant 18 h pour l'essai « Aw 0,98 » et pendant 24 h pour les essais « PH 4,7 » et « NaCl 4 % p/v ». Après cette période le volume du dispositif n'est plus assez grand pour que la production d'acide lactique reste minimale. Pour chacun, les paramètres de croissance ont été identifiés avant que le dispositif ne fonctionne plus en conditions non-limitantes et infinies.

Pour tous les autres essais le pH reste stable : la production d'acide lactique n'est pas suffisante pour abaisser le pH du milieu de culture. Le milieu MYG fonctionne donc comme un milieu infini et non-limitant pendant toute la durée de la cinétique.

Pour la cinétique « PH 4,1 », les points 27 et 30 h sont considérés comme aberrants car le pH aurait dû rester stable et non augmenter.

Au vu des résultats, il est donc possible de comprendre et d'interpréter l'influence des facteurs environnementaux sur la croissance de *L. sakei*.

DISCUSSION

Au cours de la discussion, les limites du dispositif seront présentées ainsi que la comparaison des différents paramètres influençant la croissance afin de voir lesquels jouent le rôle le plus important dans la croissance de *Lactobacillus sakei*. Une comparaison de la croissance de *L. sakei* en milieu liquide et en milieu solide sera également réalisée.

I. Performances du dispositif

A l'issu des manipulations, il est possible de comprendre dans quelle mesure le dispositif est réellement considéré comme un milieu infini et non-limitant et quels sont les paramètres qui influent l'introduction de la phase stationnaire des bactéries.

I.1. Milieu infini et non-limitant

Il a été remarqué dans le paragraphe II.2, de la partie Présentation des résultats, que le pH reste constant pour la majorité des essais démontrant ainsi que le dispositif fonctionne effectivement en milieu infini car la croissance bactérienne ne semble pas modifier la composition du milieu. Cependant, ceci n'est pas le cas pour quatre des essais réalisés («REF», «PH 4,7», «NaCl 4 % p/v» et «Aw 0,98») dans lesquels le pH commence à diminuer indiquant que le milieu devient non-limitant au cours de la phase stationnaire. Afin de mettre en évidence la relation entre la diminution du pH et l'accroissement de la population bactérienne, les populations bactériennes de chaque essai ont été comparées (Tableau 8) au point de cinétique où le pH commence à diminuer (t_{pH}).

Tableau 8 : L. sakei présents sur la membrane lorsque le milieu devient non-limitant

Essai	t_{pH} (h)	N (UFC/cm ²)
REF	13	$4,3.10^6$ ($1,5.10^6$)
PH 4,7	24	$3,6.10^6$ ($1,2.10^6$)
NaCl 4 % p/v	24	$3,8.10^6$ ($2,1.10^6$)
Aw 0,98	18	$4,1.10^6$ ($1,3.10^6$)
moyenne	-	$4,0.10^6$ ($3,1.10^5$)

Les résultats sont présentés sous la forme : moyenne (écart-type).

Au moment où le pH s'abaisse, la population bactérienne est similaire pour les quatre essais : elle est en moyenne de $4,0.10^6$ ($3,1.10^5$) UFC/cm². Il a donc été remarqué que le milieu de culture est infini et non-limitant jusqu'à ce que la population bactérienne atteigne ce seuil. Au-delà de cette valeur, la production d'acide lactique par les bactéries devient suffisante pour abaisser le pH du milieu de culture.

I.2. Induction de la phase stationnaire

Selon la formulation du milieu MYG, la phase stationnaire est induite à des heures différentes : elle débute au bout de 9 h de cinétique pour l'essai de référence, au bout de 15 h pour l'essai « PH 4,7 » et au bout de 27 h pour l'essai « NaCl 4 % p/v ». Si l'entrée en phase stationnaire des bactéries se fait lorsque le milieu est considéré comme infini, lequel des phénomènes suivants est responsable de l'induction de la phase stationnaire ?

- un épuisement des ressources nutritionnelles du milieu ;
- une accumulation des déchets du métabolisme ;
- un encombrement stérique de la membrane ;

Pour l'essai de référence, l'induction de la phase stationnaire des bactéries se fait pendant que le bouillon de culture est considéré comme infini. Les analyses de la consommation de glucose ont montré qu'au bout de 24 h la teneur en glucose était supérieure à 4 g/l (teneur initiale d'environ 5 g/l). L'arrêt de la phase exponentielle de croissance n'est donc pas dû à l'épuisement des ressources nutritionnelles du milieu.

De plus, lorsque que la phase stationnaire débute, le pH du milieu est encore stable à la valeur initiale de 5,6, ce qui signifie que la production d'acide lactique n'est pas suffisante pour induire l'arrêt de la croissance. L'entrée en phase stationnaire n'est donc pas due à une accumulation de déchets dans le bouillon.

Il semblerait donc que l'entrée en phase stationnaire de l'essai de référence soit donc induite par l'encombrement stérique de la membrane qui est de $3,7.10^6$ ($2,2.10^6$) UFC/cm².

Ce même niveau de population est atteint pour les essais « Aw 0,98 », « NaCl 4 % p/v » et « PH 4,7 » (Tableau 9). Cela montre que les bactéries ont réussi à s'adapter au milieu et à saturer la membrane grâce à l'accroissement de la phase de latence qui leur a permis de synthétiser les molécules nécessaires à leur adaptation au milieu de culture. Etant donné que le pH est encore stable lorsque l'entrée en phase stationnaire est induite, il est également possible de supposer que l'entrée en phase stationnaire est due à un encombrement stérique qui est en moyenne de $2,4.10^6$ ($1,7.10^6$) UFC/cm².

*Tableau 9 : Récapitulatif du nombre de *L. sakei* (N) lors de l'entrée en phase stationnaire et de N_{max} pour chaque essai*

	N (UFC/cm ²)	N_{max} (UFC/cm ²)
REF	$3,7.10^6$ ($2,2.10^6$)	$1,8.10^7$ (-)
Aw 0,98	$2,0.10^6$ ($4,8.10^5$)	$4,3.10^6$ ($1,3.10^6$)
NaCl 4 % p/v	$3,8.10^6$ ($2,1.10^6$)	$3,8.10^6$ ($2,1.10^6$)
PH 4,7	$2,2.10^6$ ($9,6.10^5$)	$1,1.10^7$ ($5,5.10^6$)
Aw 0,96	$1,5.10^6$ (-)	$2,0.10^6$ (-)
NaCl 6 % p/v	$5,3.10^5$ (-)	$8,7.10^5$ (-)
PH 4,1	$9,5.10^4$ ($7,2.10^4$)	$1,8.10^5$ (-)
AH 0,3 % p/v	$2,6.10^5$ (-)	$3,1.10^5$ ($1,5.10^5$)

Les résultats sont présentés sous la forme : moyenne (écart-type).

Pour les autres essais, l'entrée en phase stationnaire est initiée avant que la saturation de la membrane soit atteinte. Cela est dû à une formulation trop éprouvante du milieu de culture qui crée un stress trop important pour les cellules de *L. sakei*, les empêchant de se développer pleinement et d'atteindre la limite de saturation de la membrane.

Un phénomène particulier est apparu pour les essais « REF » et « PH 4,7 » : après quelques heures en phase stationnaire, la croissance bactérienne a repris malgré l'encombrement stérique de la membrane et la diminution du pH du milieu de culture. Malgré le fait que la disposition des bactéries sur la membrane (à l'aide d'un microscope à épifluorescence par exemple) n'ait pas été observée, il a tout de même été supposé que les bactéries formaient un biofilm afin de continuer leur croissance.

Un biofilm est défini comme une communauté microbienne immobilisée sur une surface et s'entourant d'une matrice de polymères organiques (Briandet, 1999). La croissance d'un biofilm se fait en plusieurs étapes :

- les bactéries se fixent sur la membrane de manière réversible grâce à des interactions faibles (van der Waals et électrostatiques) ;
- les cellules sécrètent des exopolymères afin de se fixer de manière irréversible au support grâce à des liaisons hydrophobes (Boulangé-Petermann, 1996) ;
- les bactéries colonisent le support en se multipliant jusqu'à saturation. La fixation définitive des bactéries et la colonisation du support sont accompagnées de la sécrétion de polymères extracellulaires ou EPS (Exo Poly Saccharide) qui forment un film protecteur autour des bactéries. Les EPS renferment en majorité des polysaccharides macromoléculaires et en moindre mesure des protéines, des lipides et acides nucléiques (Carpentier, 1999) ;
- les bactéries subissent une croissance exponentielle se traduisant par une augmentation de l'épaisseur du biofilm jusqu'à former un film hétérogène tridimensionnel. Dans cette structure se forment des canaux permettant la circulation de nutriments et d'oxygène ainsi que l'évacuation des produits issus du métabolisme bactérien ;
- l'épaisseur du biofilm se stabilise lorsque les phénomènes d'arrachement du biofilm compensent sa croissance (Costerton et al., 1999).

La formation d'un biofilm autour de la structure cellulaire rend les bactéries plus résistantes aux facteurs environnementaux (pathogènes, déshydratation, privation nutritionnelle...) et aux agents antimicrobiens.

Dans le cas des essais « REF » et « PH 4,7 », la reprise de la croissance à l'issue de la première phase stationnaire correspondrait au début de l'augmentation de l'épaisseur du biofilm.

Ce phénomène n'a été observé que pour ces deux essais car se sont les deux cinétiques où le nombre de points est le plus important. Afin de confirmer si ce phénomène existe aussi pour les autres essais, il aurait fallu réaliser des cinétiques plus détaillées.

Afin de mieux comprendre les différences de croissance entre les essais, l'influence des paramètres sur la croissance de *L. sakei* va être analysée.

II. Influence des paramètres sur la croissance de *L. sakei*

II.1. Influence de l' a_w sur la croissance de *L. sakei*

D'après les courbes présentées dans la partie Présentation des résultats (Figure 14), lorsque l'activité en eau du milieu MYG diminue, la durée de la phase de latence augmente et μ_{\max} diminue. Cela confirme les effets de l' a_w obtenus en milieu liquide (Leroy et de Vuyst, 1999) : plus l' a_w est basse, moins l'eau est disponible pour les bactéries qui ont du mal à se développer et peuvent souffrir de déshydratation.

Les bactéries se maintiennent en vie à une a_w de 0,93 : cette information est intéressante car à l'issue de l'étape de DII dans le procédé innovant, les produits carnés pourraient posséder en surface la même a_w que la solution d'immersion qui est au minimum de 0,93. Il est donc possible d'envisager d'inoculer *L. sakei* sur les pièces de viande immédiatement après l'étape de déshydratation-imprégnation par immersion sans impacter sur la survie de *L. sakei*. Ceci

éviterait d'attendre que l' a_w du produit s'équilibre ce qui présente deux avantages non négligeables :

- cela permet d'éviter le développement d'une flore exogène indésirable sur les morceaux de viande avant l'inoculation par *L. sakei* ;
- cela permet un gain de temps (18 à 24 h) dans la réalisation du procédé de fabrication ce qui à long terme induit un gain financier pour les producteurs ou entreprises qui initieront ce procédé.

II.2. Influence de la concentration en NaCl sur la croissance de *L. sakei*

D'après les courbes présentées dans la partie Présentation des résultats (Figure 16), lorsque la concentration en sel augmente, la durée de la phase de latence s'allonge et μ_{max} diminue. Cela confirme les effets du sel obtenus sur *L. sakei* en milieu liquide (Doßmann et al., 1996) : plus la concentration en sel s'intensifie, moins l'eau est disponible pour les bactéries ce qui a des conséquences sur leur croissance.

Les bactéries se maintiennent en vie lorsque la concentration en sel est de 7 % p/v : cette information est intéressante car à l'issue de l'étape de DII les produits carnés possèdent au maximum en surface, une concentration en sel de 5,5 %. Il est donc possible d'envisager d'initier l'étape de fermentation immédiatement après la déshydratation-imprégnation sans impacter sur la survie de *L. sakei*.

Des concentrations en sel de 4 et 6 % p/v entraînent une diminution de l' a_w du milieu MYG à 0,98 et 0,96 respectivement. Le sel entraîne d'une part une diminution de l' a_w et d'autre part une augmentation de la concentration en ions Na^+ . L'effet d'une baisse d' a_w en eau seule ayant été étudiée, les essais tels que réalisés permettent de découpler l'effet global du sel. D'après les résultats obtenus, le sel a une influence supplémentaire vis-à-vis de la croissance de *L. sakei* par rapport à l'activité de l'eau (Figure 23).

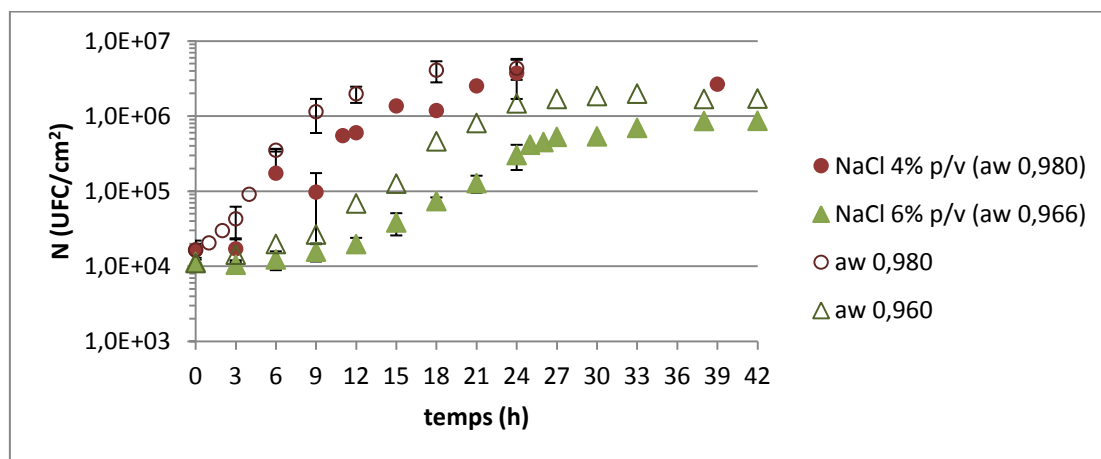


Figure 23 : Influence de la molécule sel sur la croissance de *L. sakei*

Pour deux cinétiques ayant une a_w de 0,98, l'une où l' a_w est diminuée avec du glycérol et l'autre où l' a_w est diminuée par l'ajout de 4 % p/v de NaCl, c'est cette dernière qui possède une croissance moins importante. En effet, pour la courbe « NaCl 4 % p/v », la phase de latence est plus longue et μ_{max} est inférieur par rapport à la courbe « A_w 0,98 ». Il en est de même pour les courbes « A_w 0,96 » et « NaCl 6 % p/v ». Malgré une croissance moins rapide pour la courbe « NaCl 6 % p/v », *L. sakei* finit par s'adapter aux contraintes du milieu et N_{max} devient similaire au bout de 42 h ($8,7 \cdot 10^5$ UFC/cm² pour l'essai « NaCl 6 % p/v » et

$1,7 \cdot 10^6$ UFC/cm² pour l'essai « Aw 0,96 »). La molécule sel joue un effet répresseur important qui vient s'ajouter à son effet osmo-dépresseur.

Dans la bibliographie, les articles relatant l'influence de la molécule sel sur le développement bactérien expliquent majoritairement l'effet du sel comme osmo-dépresseur. Peu de références abordent le sujet de l'effet de la molécule sel en elle-même : la molécule est-elle toxique ou modifie-t-elle l'équilibre ionique de la bactérie ? Un article de Tempest et Meers (1968) relate que la molécule de sel serait toxique à forte dose car elle bloquerait l'absorption du magnésium par les bactéries tandis qu'un article de Theys et al. (2010) explique qu'il s'agit des ions Na⁺ qui seraient toxiques pour la bactérie.

II.3. Influence du pH et de la concentration en acide lactique non-dissocié sur la croissance de *L. sakei*

D'après les courbes présentées dans la partie Présentation des résultats (Figure 18), lorsque le pH du milieu de culture diminue, la durée de la phase de croissance augmente et μ_{\max} diminue. Cela confirme les effets du pH obtenus en milieu liquide (Hufner et al., 2007) : il modifie la perméabilité de la membrane en bloquant la diffusion des cations vers l'intérieur des cellules et ralentit le métabolisme cellulaire.

Lorsque la concentration en acide lactique non-dissocié augmente, la phase de latence s'allonge et μ_{\max} diminue (Figure 20). Cela confirme les effets d'AH obtenus en milieu liquide (Matsumoto et al., 2004) : AH diffuse au travers de la membrane et se dissocie dans le cytoplasme en A⁻ + H₃O⁺ ce qui provoque un abaissement du pH intracellulaire et a pour conséquence la déstabilisation de la mécanique cellulaire.

L'acide lactique entraîne d'une part une diminution du pH et d'autre part une augmentation de la concentration en acide lactique. L'effet d'une baisse de pH seul ayant été étudié, les essais tels que réalisés permettent de découpler l'effet global de l'acide lactique.

Les résultats montrent que l'influence de la molécule AH est plus importante que l'influence du pH. En effet, à pH égal, l'ajout de 0,3 % p/v d'acide lactique non-dissocié engendre une augmentation de la phase latence et une diminution de la vitesse spécifique de croissance (Figure 24).

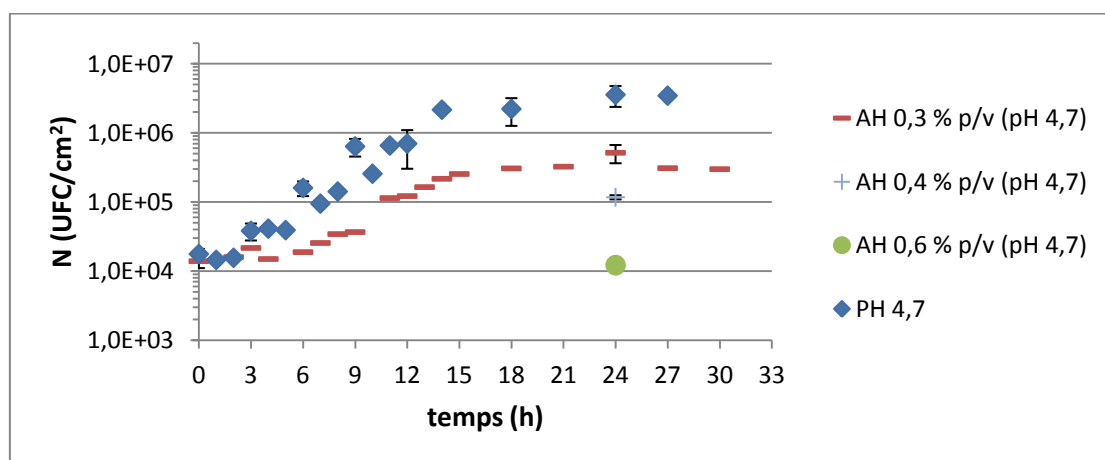


Figure 24 : Influence de la molécule AH sur la croissance de *L. sakei*

Les produits carnés fermentés présentent une concentration en acide lactique de l'ordre de 2 % et un pH de l'ordre de 4,7 (Durand, 1999a). D'après des calculs, cela correspond à une

concentration en AH de l'ordre de 0,35 %. Or la croissance de *L. sakei* est réduite à zéro lorsque la concentration en AH atteint 0,6 % p/v ou que le pH devient inférieur à 4,0-4,1.

Lors du processus de fermentation des produits carnés, l'acide lactique peut s'accumuler en surface et inhiber la croissance bactérienne de part l'accumulation des ions H_3O^+ et de AH. Il est donc possible que le pH en surface des pièces de viande devienne par moment inférieur à 4,7 et que la concentration en AH devienne supérieure 0,35 %. Afin de prévoir dans quelle mesure cela peut affecter la croissance de *L. sakei*, une modélisation de la cinétique d'accumulation de l'acide lactique est envisagée dans le cadre de la thèse dans lequel s'inscrit ce stage. Cette modélisation prendra en compte la diffusion de l'acide lactique entre la surface et le cœur d'un morceau de viande.

Les résultats obtenus montrent que pour de fortes concentrations en AH ou un pH de 4,0 les bactéries ne meurent pas mais se maintiennent en vie : il faudra donc attendre que les déchets métaboliques issus de la fermentation (production d'acide lactique, ions H_3O^+) s'équilibrent au sein de la matrice viande pour que la croissance reprenne.

III. Initiation et évolution de la croissance de *L. sakei*

III.1. Initiation de la croissance de *L. sakei*

Dans le cadre du plan d'expériences présenté dans le Tableau 1, les conditions idéales de croissance de *L. sakei* correspondent à la formulation de l'essai de référence ($a_w=1$, NaCl=0 % p/v, pH 5,6 et AH=0 % p/v). Lors de la formulation des morceaux de viande par DII, ces conditions peuvent ne pas être satisfaites : la viande s'imprègne en sel et en sucre, perd de l'eau et voit son a_w diminuer en conséquence. Dans quelle mesure la viande peut-elle être formulée par l'étape de DII afin que la croissance de *L. sakei* se déroule le plus rapidement possible ?

Lors de l'initiation de la fermentation des produits carnés, ce sont l' a_w et la concentration en sel qui vont orienter la vitesse de croissance et la phase de latence de *L. sakei*.

Après DII, les produits carnés pourraient posséder en surface la même a_w et la même teneur en sel que la solution d'immersion. Celles-ci peuvent être à l'extrême de 0,93 et de 5,5 % (Tableau 10). Si la fermentation est initiée juste après la DII, les bactéries se maintiendront en vie mais ne se développeront pas immédiatement en raison de l'action couplée d'une teneur en sel de 5,5 % et d'une a_w de 0,93.

Tableau 10 : Caractéristiques des filets de viande à l'issue d'un traitement de DII de 5h (Bros et al., 2012)

	Aw	T_{sel} (%)	T_{eau} (%)	T_{glucose} (%)
Filets avant DII	1,00 (0,001)	0,07 (0,01)	75,0 (0,6)	0,30 (0,14)
Solution de DII	0,93	5,50	-	-
Filets après Stabilisation (18h)	0,975 (0,001)	2,72 (0,12)	64,9 (0,8)	0,51 (0,09)

La croissance débutera lorsque l' a_w et la concentration en sel se seront stabilisées à des valeurs inférieures. Ainsi, si l'inoculation se fait immédiatement après la DII, *L. sakei* pourra

coloniser le milieu dès l'instant où les conditions deviendront favorables et les flores indésirables plus sensibles au sel et à l'activité en eau ne pourront pas s'installer.

Si la fermentation est initiée après que les composés se soient équilibrés au sein de la matrice viande, μ_{\max} sera plus élevé : lorsque les filets de viande sont équilibrés, l' a_w est de 0,975 (0,001) et la concentration en sel de 2,7 (0,12) %.

La durée de la phase latence est déterminée par la concentration en sel présente dans le milieu (Tableau 11). Les bactéries ont plus de difficultés à s'adapter en présence de sel : en effet, la phase de latence est de 10 h en présence de 6 % p/v de sel alors qu'elle est seulement de 6 h pour une a_w de 0,96. Par contre, au vu des résultats obtenus, il n'est pas possible de déterminer lequel des deux paramètres influence le plus la vitesse spécifique de croissance maximale.

Tableau 11 : Récapitulatif de μ_{\max} , G et de λ pour chaque essai

	$\mu_{\max} (h^{-1})$	$\lambda (h)$	G (h)
REF	0,67	0,35	1,03
Aw 0,96	0,27	5,65	2,57
Aw 0,98	0,53	0,78	1,31
NaCl 6 %	0,23	9,63	3,07
NaCl 4 %	0,23	3,00	2,97
PH 4,1	0,15	5,25	4,59
PH 4,7	0,37	2,42	1,85
AH 0,3 %	0,31	5,15	2,27

Pour pallier aux éventuels problèmes de phase de latence, l'inoculation de la viande avec une pré-culture de *L. sakei* préalablement adaptée dans un milieu contenant de fortes concentrations en sel pourrait réduire la durée de la phase de latence (Hufner et Hertel, 2008).

III.2. Réponse de *L. sakei* aux évolutions environnementales lors de la fermentation

Au cours de la fermentation, du fait du métabolisme de *L. sakei* deux nouvelles contraintes viennent s'ajouter à la présence de sel et à l' a_w réduite du milieu : une diminution du pH (augmentation des ions H_3O^+) et une augmentation de la concentration en acide lactique (et donc en AH). L'accumulation de ces facteurs à la surface pourrait provoquer un arrêt prématuré du développement, ou induire des phases stationnaires temporaires en attendant que la surface de la viande soit à nouveau un milieu favorable à la croissance de *L. sakei*. Cela pourrait ralentir le processus de fermentation en passant d'un μ_{\max} élevé à des valeurs plus faibles : μ_{\max} est de 0,37 h^{-1} pour pH 4,7 et 0,31 h^{-1} pour AH 0,3 % p/v.

La production d'acide lactique non-dissocié et donc l'abaissement du pH se font majoritairement lorsque la croissance microbienne est maximale c'est-à-dire pendant la phase exponentielle de croissance. Dans le dispositif (pour l'essai de référence) la production d'acide lactique est de 0,37 (0,02) g/l au bout de 24 h et le pH d'environ 5,0 (0,07) ce qui correspond à une teneur en AH de 0,1 g/l. Or, la limite de croissance de *L. sakei* est de 5,0 g/l : μ_{\max} ne sera pas perturbé par la production d'acide lactique au cours des 24 premières heures. Afin de prévoir dans quelles mesures cela peut affecter la croissance de *L. sakei*, une modélisation de la cinétique d'accumulation de l'acide lactique est envisagée.

La durée de l'étape de fermentation reste encore à définir. En milieu liquide, 40 h sont nécessaires pour abaisser le pH du milieu de culture de 5,6 à 4,7 (Hufner et al., 2007). Dans le cas du procédé de fermentation du saucisson, cette étape dure entre 48 h et 92 h. Ces temps

sont plus importants qu'en milieu liquide car la mûlée de saucisson est un milieu solide où les nutriments sont moins disponibles qu'en milieu liquide. Cette durée de 48 h à 92 h est une indication quant à la durée de l'étape de fermentation dans le cadre de la mise au point du procédé innovant de fermentation des morceaux de viande, mais elle pourrait être rallongée si les coefficients de diffusion du sucre et de l'acide lactique ralentissent la fermentation. Des expériences devront donc être réalisées afin de déterminer la durée idéale qui permettra à la fois une bonne formulation par le métabolisme fermentaire et une bonne stabilisation du produit vis-à-vis des micro-organismes.

Une dernière question se pose par rapport à l'utilisation du glucose : les bactéries lactiques vont-elles réussir à capter tout le glucose nécessaire, ou vont-t-elles dégrader les autres sucres de la viande tels que l'arginine ?

Lors des essais, ce paramètre a été exclu du plan d'expériences. En effet, bien que *L. sakei* consomme peu de glucose (Tableau 3), il aurait pu être intéressant de chercher la concentration minimale nécessaire à sa croissance.

Cette limite est très faible car un essai préliminaire en dispositif a montré qu'une concentration initiale en glucose de 0,1 g/l au lieu de 5 g/l n'était pas limitante. Aussi, une formulation en glucose par DII à des teneurs de 0,5g/100g (Bros et al., 2012) est largement suffisante et peut être facilement augmentée si nécessaire. C'est l'étude de la diffusion du glucose dans la viande au cours de la fermentation, réalisée dans une autre partie de la thèse qui définira s'il est utile de déterminer la concentration en glucose limite de croissance de *L. sakei*.

Il a été démontré que lorsque *L. sakei* dégrade l'arginine (quand le glucose devient limitant) en milieu liquide, le pH final est plus élevé que la valeur initialement prévue (Montel et Champomier, 1987). Cela pourrait donc nuire au procédé de stabilisation des produits carnés.

IV. Différence de croissance de *L. sakei* en milieu liquide et en milieu solide

Il n'est pas évident de comparer la croissance des bactéries en milieu solide avec celle en milieu liquide obtenue dans la bibliographie. En effet, en plus de l'incompatibilité entre les unités (UFC/cm² vs UFC/ml) qui oblige à comparer uniquement les μ_{\max} , il est difficile de trouver des conditions initiales (pH, température, milieu de culture) identiques afin de pouvoir évaluer les différences de croissance.

Cependant, il est possible de trouver des points de comparaison pour les essais « NaCl 4 % p/v », « REF » et « Aw 0,96 ». Concernant la croissance en présence de 4 % de NaCl, la croissance est deux fois plus rapide en milieu liquide qu'en milieu solide : μ_{\max} de 0,45 h⁻¹ en milieu liquide et de 0,23 h⁻¹ en milieu solide (Doßmann et al., 1996).

Pour l'essai de référence, l'effet inverse est observé. En effet, en milieu liquide μ_{\max} se situe entre 0,45 h⁻¹ et 0,55 h⁻¹ lorsque les conditions optimales de croissance sont réunies (pH =6,5, T°=30 °C et a_w=1). Lors des manipulations en milieu solide, le μ_{\max} est de 0,66 h⁻¹ pour des conditions expérimentales moins avantageuses pour *L. sakei*. En effet, le pH n'est que de 5,6 et la température de 25 °C.

Pour une a_w de 0,96, μ_{\max} est de 0,28 h⁻¹ en phase liquide à une température de 30°C (Samapundo et al., 2010) et de 0,27 h⁻¹ en milieu solide à une température de 25 °C. La différence de croissance n'est pas si différente au regard de la différence de température.

Au vu des résultats obtenus, il est difficile de se faire une idée de la différence de croissance entre milieu liquide et milieu solide car les expériences réalisées ne sont pas identiques. Pour l'essai de référence, la différence provient sûrement du fait que dans les expériences en milieu liquide, les bactéries utilisées ont été isolées de flores naturellement présentes dans le saucisson et sont moins performantes que les starters congelés (utilisés lors des expériences en dispositif) qui sont des souches sélectionnées pour leurs performances (résistance, capacité d'adaptation, vitesse spécifique de croissance, vitesse de production d'acide...) (Ammor et al., 2005).

Afin de pouvoir apercevoir une réelle différence entre les essais en milieu solide et en milieu liquide, il aurait fallu en parallèle des cinétiques en dispositif, réaliser des essais en milieu liquide. Cela aurait permis de voir s'il existait un coefficient de correction entre les deux modes de croissance microbienne. Si tel était le cas, il aurait été envisageable de réaliser des cinétiques en milieu liquide puis d'appliquer un coefficient de correction afin d'obtenir les courbes en milieu solide. Ce procédé aurait été plus simple en termes de manipulation puisqu'en milieu liquide la fermentation peut être étudiée dans un fermenteur, dans des tubes ou dans des microplaques de 96 puits, ce qui permet de prélever des échantillons de substrat régulièrement et non de sacrifier un dispositif par point de cinétique.

V. Microbiologie des produits carnés

Des études réalisées sur les produits salés séchés fabriqués dans les pays du Sud ont montré que ces derniers ne respectaient pas les normes sanitaires microbiologiques (Bryan et al., 1988). Ils peuvent contenir des staphylocoques, des coliformes dont *Escherichia coli*, des salmonelles, des levures et des moisissures. Par exemple, une étude sur le kilishi, montre des valeurs supérieures à 10⁵ UFC/g pour la flore aérobie mésophile totale (FAMT), *Salmonella*, *S. aureus* et les coliformes fécaux (Mbawala et al., 2010). Pour être reconnus officiellement aptes à la consommation, les produits de charcuterie doivent respecter des valeurs seuils qui sont de 3,10⁵ UFC/g pour la FAMT, 10² UFC/g pour *S. aureus*, 10³ UFC/g pour les coliformes fécaux, 50 UFC/g de micro-organismes sulfites réducteurs et une absence totale de *Salmonella* et de *Listeria* dans 25 g de produit (Journal Officiel de la République Française, 1980).

Les niveaux élevés de flores indésirables retrouvés dans les produits vendus sur les marchés s'expliquent principalement par les conditions de fabrication. En effet, une FAMT totale élevée résulte principalement de la présence de poussières et de mouches qui sont vecteurs de spores, de bactéries et de champignons. La présence de staphylocoques et de coliformes résultent des mauvaises conditions d'hygiène lors de la préparation des produits carnés (ex : hygiène des mains des manipulateurs). Les salmonelles, les listérias et les coliformes fécaux peuvent apparaître lorsque l'eau de nettoyage du matériel est polluée ou lorsque le matériel est mal désinfecté. Les salmonelles contaminent la viande lors de l'abatage et de la découpe des carcasses (Mbawala et al., 2010).

Le procédé de DII suivi d'une fermentation et d'un séchage devrait permettre de modifier les caractéristiques microbiologiques des produits carnés afin qu'ils deviennent hostiles au

développement des micro-organismes indésirables. Des études ont montré que le séchage diminuait fortement la prolifération des micro-organismes et pouvait les inhiber en raison d'un abaissement important de l' a_w (Leach et al., 1959).

De plus, il a été prouvé que lors de la fermentation lactique, *L. sakei* possédait une forte activité antimicrobienne (diminution du pH, production d'acide lactique, de bactériocines et mobilisation des ressources nutritionnelles) contre *L. monocytogenes*, *S. aureus*, *E. coli*, *Salmonella* et *C. botulinum* (Aymerich et al., 2008). D'après Papathomopoulou et Kotzekidou (2009), les quantités de bactériocines et d'acide lactique produites lors de fermentation sont capables d'inhiber totalement *E. coli* et *L. monocytogenes*.

Malgré les performances du procédé de fermentation, il a été remarqué par Verdy (2008) que lors de l'étape de DII la population microbienne augmentait (5,8 à 6 UFC/g). Cependant, Deumier et al. (1996) ont étudié l'impact d'un traitement de DII sur la flore totale de la viande de venaison et ont trouvé des résultats antagonistes. Un traitement de DII contenant 18,7 % de sel (avec une imprégnation finale en sel de 2,3% dans le produit) a la capacité de réduire la flore aérobie mésophile totale initiale de la viande de $1,3.10^1$ UFC/cm² et a un effet inhibiteur sur les coliformes, probablement dû à la forte pression osmotique de la solution et à l'effet inhibiteur du sel sur la croissance des bactéries. L'influence de la température peut également jouer un rôle sur le développement de la flore lors de la DII car Deumier et al. (1996) ont travaillé à une température de 4 °C tandis que Verdy (2008) a travaillé à 25 °C.

Le couplage de la DII, de la fermentation lactique et du séchage devrait être suffisant pour assainir microbiologiquement les produits carnés si des précautions sont prises au préalable lors de l'abatage, de la désinfection du matériel et de l'hygiène du personnel.

VI. Transfert du procédé dans les pays du Sud

Ce procédé tend à long terme à être transféré à l'échelle semi-artisanale dans les pays du Sud. Il est nécessaire qu'il soit simple, facile à mettre en œuvre et qu'il ne nécessite pas d'investissement important de la part des producteurs.

Afin d'adapter ce procédé à l'échelle semi-artisanale, la formulation de la solution de DII a été repensée afin de trouver un remplacement pour le DE21 (hydrolysate d'amidon de maïs contenant un mélange de glucose, et de polymères de glucose) qui coûte relativement cher. Des essais ont été réalisés en remplaçant le DE21 par une solution de mélasse de canne à sucre, production locale à l'île de la Réunion. Les résultats n'ont pas été très concluants car les molécules de saccharose étant plus petites, pénètrent plus facilement à l'intérieur de la matrice viande ce qui pourrait donner un goût légèrement sucré au produit. Seules des analyses sensorielles pourront dire si une viande fermentée de type viande de grison pourrait être acceptée par les populations locales avec un goût sucré.

CONCLUSION

Le dispositif expérimental conçu pour l'étude de la croissance bactérienne en surface fonctionne bien comme un milieu infini : la quantité de substrat consommé est non-limitante et la production de déchets métaboliques négligeable par rapport à la croissance bactérienne. Cette affirmation est vérifiée jusqu'à ce que la population bactérienne atteigne un seuil de $4,0 \cdot 10^6$ UFC/cm². Au delà, la production d'acide lactique n'est plus négligeable par rapport au volume du dispositif (100 ml). Toutefois, ce seuil est suffisamment élevé pour que la phase exponentielle de croissance et le début de la phase stationnaire soient observés pour toutes les cinétiques. Ceci a permis de caractériser la croissance de *Lactobacillus sakei* dans l'ensemble des conditions expérimentales dictées par le plan d'expériences.

Ainsi, les limites de croissance de *L. sakei* ont été déterminées en fonction de quatre paramètres environnementaux : l'activité en eau (a_w), la teneur en sel (NaCl), le pH et la concentration en acide lactique non-dissocié (AH) : $0,930 < a_w < 0,945$, $4 \% \text{ p/v} < \text{NaCl} < 6 \% \text{ p/v}$, $4,0 < \text{pH} < 4,1$ et $0,4 \% \text{ p/v} < \text{AH} < 0,6 \% \text{ p/v}$. En dessous de ces seuils, la croissance s'arrête mais il n'y a pas de mort cellulaire.

Ce travail a montré que le sel a un effet supplémentaire à l' a_w et que l'acide lactique a un effet supplémentaire par rapport au pH. L'effet de valeurs intermédiaires sur la croissance de *L. sakei* a également été étudié.

Dans le procédé de fermentation, l'initiation de la fermentation dépendra de l' a_w et de la teneur en sel des morceaux de viande, paramètres pilotés par l'étape de Déshydratation-Imprégnation par Immersion (DII) qui précède la fermentation. La durée de la phase de latence dépendra principalement de la teneur en sel. Au vu des résultats, il est envisageable d'initier l'étape de fermentation directement à l'issue de la DII sans attendre que les concentrations en sel et en sucre se stabilisent dans les produits. Cela permettra un gain de temps et limitera la contamination des produits par une flore extérieure.

Au cours de la fermentation, deux nouvelles contraintes viennent s'ajouter à la croissance de *L. sakei* du fait de son propre métabolisme fermentaire qui consomme du sucre et produit de l'acide lactique : une diminution du pH (augmentation des ions H^+) et une augmentation de la concentration en acide lactique (et donc en AH). L'accumulation de ces facteurs pourrait provoquer un arrêt prématuré du développement ou induire des phases stationnaires temporaires en attendant que la surface de la viande redevienne un milieu favorable à la croissance de *L. sakei*. Cela pourrait ralentir le processus de fermentation.

Par la suite, une étude intégrant la diffusion du sucre et de l'acide lactique permettra d'évaluer leurs valeurs à la surface de la viande et donc leurs influences sur la croissance. A long terme, lorsque ce procédé innovant sera finalisé, il est envisagé qu'il soit transposé aux pays du Sud et appliqué à l'échelle semi-artisanale.

BIBLIOGRAPHIE

- Aasen I, Moretro T, Katla T & Axelson L (2000). Influence of complex nutrients, temperature and pH on bacteriocin production by *Lactobacillus sakei* CCUG 42687. *Appl. Microbiol. Biotechnologie*, **53**:153-166.
- Ammor S, Dufour E, Zagorec M, Chaillou S & Chevallier I (2005). Characterization and selection of *Lactobacillus sakei* strains isolated from traditional dry sausage for their potential use as starter cultures. *Food Microbiology*, **22**(6):529-538.
- Antwi M, Bernaerts K, Van Impe JF & Geeraerd AH (2007). Modelling the combined effects of structured food model system and lactic acid on *Listeria innocua* and *Lactococcus lactis* growth in mono- and coculture. *International Journal of Food Microbiology*, **120**(12):71-84.
- Assamoi A, Destain J & Thomart P (2009). Aspects microbiologiques de la production par fermentation solide des endo- β -1,4-xylanases de moisissures : le cas de *Penicillium canescens*. *Biotechnologie, Agronomie, Société et Environnement*, **13**(2):281-294.
- Aymerich T, Picouet PA & Monfort JM (2008). Decontamination technologies for meat products. *Meat Science*, **78**(1-2):114-129.
- Baudry C & Brezellec H (2006). Croissance d'une population bactérienne en milieu non renouvelé. In: Kluwer-wolters. *Microbiologie immunologie : exercices d'application*. France. p 27-29.
- Bekhouche F (2006). Bactéries lactiques du lait cru de vache et Micro-organismes pectinolytiques des olives noires et vertes. Génie alimentaire. Institut de la nutrition, de l'alimentation et des technologies agro-alimentaires. p. 104.
- Bellon-Maurel V, Orliac O & Christen P (2003). Sensors and measurements in solid state fermentation : a review. *Process Biochemistry*, **38**:881-896.
- Biokar-Diagnostics Gélose MRS [en ligne]. Disponible sur : < <http://lycee-valin.fr/bgb/ftech/M5K.pdf>> (consulté le 06.07.2012).
- Boulangé-Petermann L (1996). Process of bioadhésion on stainless steel surfaces and cleanability : a review with special reference to the food industry. *biofooling*, **10**(4):275-300.
- Briandet R (1999). Maîtrise de l'hygiène des surfaces par la création de biofilms : aspects physico-chimiques. Physico-chimie et Qualité des bioproduits. Rennes: ENSAR.
- Bros M, Arnaud E, Loiseau G, Talon R & Collignan A (2012). Feasibility of Coupling Dehydration-Impregnation by Soaking Treatment of Meat with Fermentation by *Lactobacillus sakei*. *Journal of Food Science*, **77**.
- Bryan FL, Michanie SC, Alvarez P & Paniagua A (1988). Critical control points of street-vended foods in Dominican Republic. *Journal of Food Protection*, **51**:373-383.
- Carpentier B (1999). Les biofilms dans l'industrie agroalimentaire. *Bull. Soc. Fr. Microbiol*, **14**(2):105-111.
- Chaillou S, Champomier-Vergès M-C, Cornet M, Crutz-Le Coq A-M, Dudez AM, Martin V, Beaufils S, Darbon-Rongere E, Bossy R, Loux V & Zagorec M (2005). The complete genome sequence of the meat-borne lactic acid bacterium *Lactobacillus sakei* 23K. *Nature Biotechnology*, **23**(12):1527-1533.
- Champomier-Vergès M-C, Chaillou S, Cornet M & Zagorec M (2001). *Lactobacillus sakei*: recent developments and future prospects. *Research in Microbiology*, **152**(10):839-848.
- Champomier-Verges MC, Zuniga M, Morel-Deville F, Perez-Martinez G, Zagorec M & Ehrlich SD (1999). Relationships between arginine degradation, pH and survival in *Lactobacillus sakei*. *FEMS Microbiology Letters*, **180**(2):297-304.

- Collignan A, Bohuon P, Deumier F & Poligné I (2001). Osmotic treatment of fish and meat products. *Journal of Food Engineering*, **49**(2-3):153-162.
- Collignan A, Santchurn SJ & Zakhia N (2008). Dehydration of muscle foods. In: Hui, YH, Clary, C, Faid, M, Fasina, O, Noomhorn, A & Welti-Chanes, Jeditors. *Food Drying Science and Technology: Microbiology, Chemistry, Application*. Lancaster: DEStech Publications Inc. p 721-744.
- Costerton J, Stewart P & Greenberg E (1999). Bacterial Biofilms: A Common Cause of Persistent Infections. *Science*, **284**:1318-1322.
- Delahaye A (2008). La croissance bactérienne [en ligne]. Disponible sur : http://www.arnobio2.com/microbiologie/la_croissance_bacterienne.pdf (consulté le 05.07.2012).
- Dellaglio H, Roissart H, Torriani S, Curk M & Jansen D (1994). Caractéristiques générales des bactéries lactiques. In: Roissart, D. *Les bactéries lactiques: aspects fondamentaux et technologiques*. p 25-116.
- Deumier F, Zakhia N & Collignan A (1996). Formulation of a cured meat product by the dewatering impregnation soaking (DIS) process: mass transfer study and assessment of product quality. *Meat Science*, **44**(4):293-306.
- Devlieghere F, Debevere J & Van Impe J (1998). Effect of dissolved carbon dioxide and temperature on the growth of *Lactobacillus sake* in modified atmospheres. *International Journal of Food Microbiology*, **41**(3):231-238.
- Devlieghere F, Geeraerd AH, Versyck KJ, Bernaert H, Van Impe JF & Debevere J (2000). Shelf life of modified atmosphere packed cooked meat products: addition of Na-lactate as a fourth shelf life determinative factor in a model and product validation. *International Journal of Food Microbiology*, **58**(1-2):93-106.
- Dortu C & Thonart P (2009). Les bactériocines des bactéries lactiques : caractéristiques et intérêts pour la bioconservation des produits alimentaires. *Biotechnologie, Agronomie, Société et Environnement*, **13**(1):143-154.
- Doßmann M, Vogel R & Hammes W (1996). Mathematical description of the growth of *Lactobacillus sake* and *Lactobacillus pentosus* under conditions prevailing in fermented sausages. *Appl Microbiol biotechnologie*, **46**:334-339.
- Duchiron F & Copinet E (2012). Fermentation en milieu solide (FMS). *technique de l'ingénieur*:1-13.
- Durand A (1998). Solid state fermentation. *Biofuture*, **181**:41-43.
- Durand A (2003). Bioreactor designs for solid state fermentation. *Biochemical Engineering Journal*, **13**:113-125.
- Durand P (1999a). Matières premières. In: TEC&DOC. *Technologies des produits de charcuterie et des salaisons*. Paris. p 47-57.
- Durand P (1999b). Technologies des produits de charcuterie et des salaisons. Paris. p 298.
- Garrity G & Holt J (2001). Taxonomic Outline of Archaea and Bacteria. *Bergey's Manual of Systematic Bacteriology*, **1**:155-166.
- Givry S (2006). Optimisation de procédés de fermentation lactique sur sirop de son de blé et purification et caractérisation d'une arabinose isomérase de *Lactobacillus bifementans*. Microbiologie industrielle. Reims: Université de Reims Champagne-Ardenne. p. 215.
- Hofvendahl K & Hahn-Hägerdal B (1998). Factors affecting the fermentative lactic acid production from renewable resources. *Enzyme and Microbial Technology*, **26**(2-4):87-107.
- Hufner E & Hertel C (2008). Improvement of raw sausage fermentation by stress-conditioning of the starter organism *Lactobacillus sakei*. *Current Microbiology*, **57**(5):490-496.

- Hufner E, Markieton T, Chaillou S, Crutz-Le Coq AM, Zagorec M & Hertel C (2007). Identification of *Lactobacillus sakei* genes induced during meat fermentation and their role in survival and growth. *Applied and Environmental Microbiology*, **73**(8):2522-2531.
- Hutkins RW (2006). Meat Fermentation. *Microbiology and technology of fermented foods*. Ames, Iowa: Blackwell Publishing. p 207-232.
- Janssen M, Geeraerd AH, Logist F, De Visscher Y, Vereecken KM, Debevere J, Devlieghere F & Van Impe JF (2006). Modelling *Yersinia enterocolitica* inactivation in coculture experiments with *Lactobacillus sakei* as based on pH and lactic acid profiles. *International Journal of Food Microbiology*, **111**(1):59-72.
- Journal.Officiel.de.la.République.Française (1980). Arrêté Ministériel du 21/12/1979 - Article 3: Critères microbiologiques relatifs aux viandes hachées, aux viandes cuites, aux produits de charcuterie, aux plats cuisinés et aux potages déshydratés.
- Kayalvizhi N & Gunasekaran P (2008). Production and characterization of a low-molecular-weight bacteriocin from *Bacillus licheniformis* MKU3. *Letters in Applied Microbiology*, **47**(6):600-607.
- Labioui H, Elmoualdi L, EL Yachoui M & Ouhssine M (2005). Sélection de souches de bactéries lactiques antibactériennes. *bulletin - Société de Pharmacie de Bordeaux*, **144**:237-253.
- Leach RH, Ohye DF & Scott WJ (1959). The death of micro-organisms during drying in relation to solute concentration and drying temperature *Journal of General Microbiology*, **21**:358-665.
- Lebert I, Dussap CG & Lebert A (2004). Effect of aw, controlled by the addition of solutes or by water content, on the growth of *Listeria innocua* in broth and in a gelatine model. *International Journal of Food Microbiology*, **94**(1):67-78.
- Lebert I, Leroy S, Giammarinaro P, Lebert A, Chacornac JP, Bover-Cid S, Vidal-carou MC & Talon R (2007a). Diversity of microorganisms in the environment and dry fermented sausages of small traditional French processing units. *Meat Science*, **76**(1):112-122.
- Lebert I, Nicolas C, Portanguen S & Lebert A (2007b). Combined water transfer and bacterial models to predict *Listeria innocua* growth on the surface of gelatine gel during the drying process. *Journal of Food Engineering*, **78**(4):1371-1381.
- Leroy F & de Vuyst L (1999). The Presence of Salt and a Curing Agent Reduces Bacteriocin Production by *Lactobacillus sakei* CTC 494, a Potential Starter Culture for Sausage Fermentation. *Applied and Environmental Microbiology*, **65**(12):5350-5356.
- Leyral G & Vierling E (2007). Croissance des populations bactériennes. In: Quatrième, é. *Microbiologie et toxicologie des aliments : Hygiène et sécurité alimentaires*. Bordeaux. p 48-50.
- Lino T, T U & Komagata K (2003). The effect of sodium acetate on the activity of L- and D-lactate deshydrogenases in *Lactobacillus sakei* NRIC 1071 and other lactic acid bacteria. *Journal of Genetic Applied Microbiology*, **5**:49-51.
- Marceau A, Zagorec M & Champomier-Verges MC (2002). Analysis of *Lactobacillus sakei* adaptation to its environment by a proteomic approach. *Sciences des Aliments*, **22**(12):97-105.
- Marceau A, Zagorec M & Champomier-Verges MC (2003). Positive effects of growth at suboptimal temperature and high salt concentration on long-term survival of *Lactobacillus sakei*. *Research in Microbiology*, **154**(1):37-42.
- Matsumoto M, Mochiduki K & Kondo K (2004). Toxicity of ionic liquids and organic solvents to lacticacid-producing bacteria. *Journal of Bioscience and Bioengineering*, **98**(5):344-347.

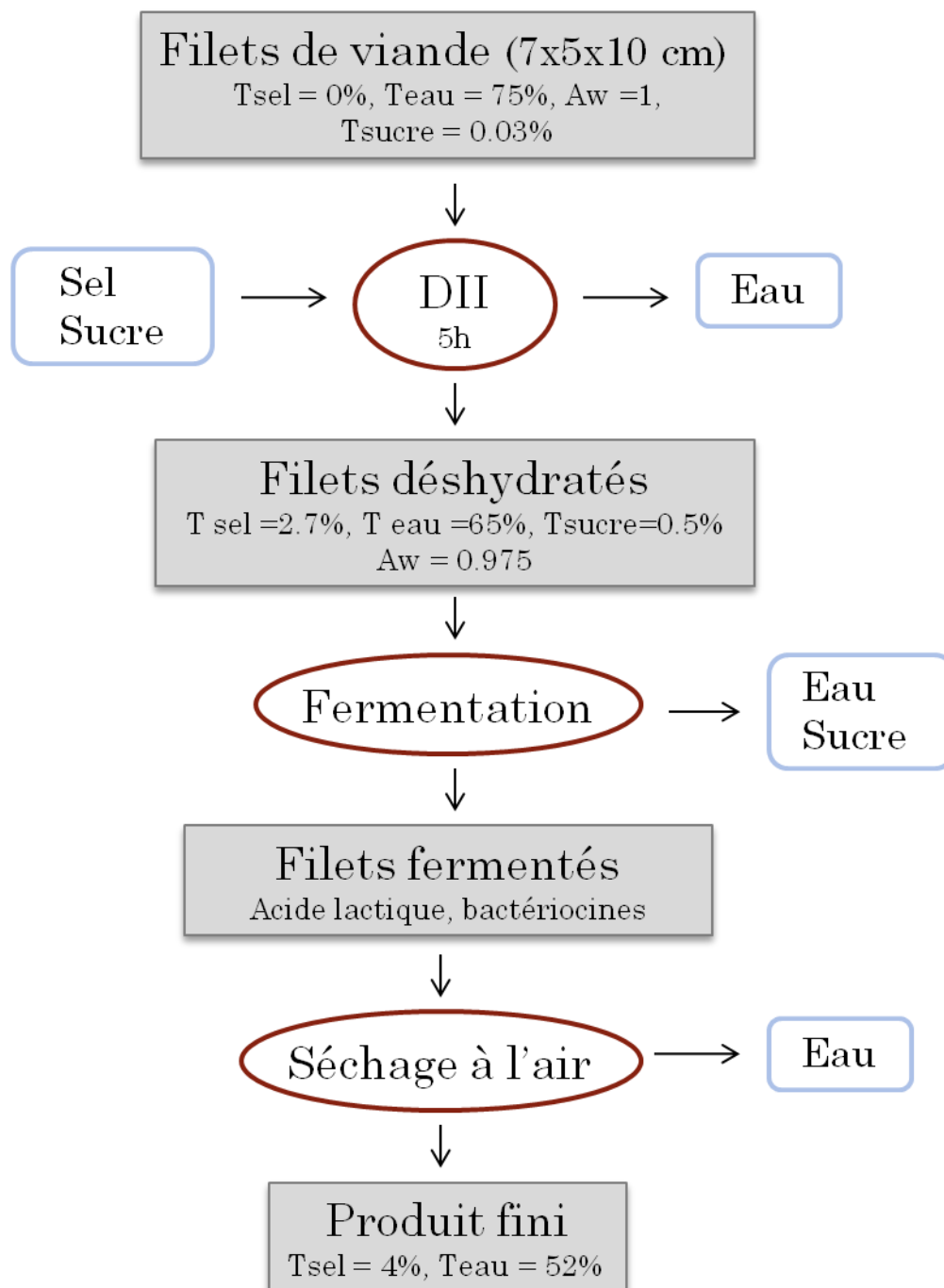
- Mbawala A, Daoudou B & Ngassoum MB (2010). Qualité microbiologique du kilishi (produit carné séché) produit dans la ville de Ngaoundéré (Cameroun). *Tropicultura*, **28**(3):153-160.
- Montel MC & Champomier MC (1987). Arginine catabolism in *Lactobacillus sakei* isolated from meat. *Applied and Environmental Microbiology*, **53**(11):2683-2685.
- Montel MC, Masson F & Talon R (1998). Bacterial role in flavour development. *Meat Science*, **49**(Supplement 1):111-S123.
- Muthulakshmi C, Gomathi D, Guru Kumar D, Ravikumar G, Kalaiselvi M & Uma C (2011). Production, Purification and Characterization of Protease by *Aspergillus flavus* under Solid State Fermentation. *Jordan journal of biological sciences*, **4**:137-148.
- Noriega E, Laca A & Díaz M (2008). Modelling of diffusion-limited growth to predict *Listeria* distribution in structured model foods. *Journal of Food Engineering*, **87**(2):247-256.
- Nortjé K, Buys EM & Minnaar A (2005). Effect of [gamma]-irradiation on the sensory quality of moist beef biltong. *Meat Science*, **71**(4):603-611.
- Pandey A (2001). Solid-state fermentation. *Biochemical Engineering Journal*, **13**:81-84.
- Papathomopoulou K & Kotzekidou P (2009). Inactivation of verocytotoxigenic *Escherichia coli* and *Listeria monocytogenes* co-cultured with *Lactobacillus sakei* in a simulated meat fermentation medium. *Journal of Food Safety*, **29**(3):331-347.
- Parente E & Ricciardi A (1994). Influence of pH on the production of enterocin 1146 during batch fermentation. *Letters in Applied Microbiology*, **19**(1):12-15.
- Prescott, Harley, Klein, Wiley, Sherwood & Woolverton (2010). La croissance. In: Boeck, D. *Microbiologie*. p 123-127.
- Rimaux T, Vrancken G, Pothakos V, Maes D, De Vuyst L & Leroy F (2011). The kinetics of the arginine deiminase pathway in the meat starter culture *Lactobacillus sakei* CTC 494 are pH-dependent. *Food Microbiology*, **28**(3):597-604.
- Rimbault M (1998). General and microbiological aspects of solid substrate fermentation. *Journal of Biotechnology*, **1**:1-20.
- Robinson T & Nigam P (2002). Bioreactor design for protein enrichment of agricultural residues by solid state fermentation. *Biochemical Engineering Journal*, **13**:197-203.
- Rodriguez Couto S & Angeles Sanroman M (2005). Application of solid-state fermentation to food industry- A review. *Journal of Food Engineering*, **76**:291-302.
- Samapundo S, Ampofo-Asiama J, Anthierens T, Xhaferi R, Van Bree I, Szczepaniak S, Goemaere O, Steen L, Dhooze M, Paelinck H, Dewettinck K & Devlieghere F (2010). Influence of NaCl reduction and replacement on the growth of *Lactobacillus sakei* in broth, cooked ham and white sauce. *International Journal of Food Microbiology*, **143**(1-2):9-16.
- Santchurn SJ, Arnaud E, Zakhia-Rozis N & Collignan A (2011). Drying: Principles and Applications. In: Hui, YH. *Handbook of Meat and Meat Processing*. Second Edition ed. Boca Raton: CRC Press. p 505-522.
- Singhania, Patel, Soccol & Pandey (2009). Recent advances in solid-state fermentation. *Biochemical Engineering Journal*, **44**:13-18.
- Sinz Q & Schwab W (2012). Metabolism of amino acids, dipeptides and tetrapeptides by *Lactobacillus sakei*. *Food Microbiology*, **29**(2):215-223.
- Smith JL & Palumbo SA (1980). Inhibition of aerobic and anaerobic growth of *Staphylococcus aureus* in a model sausage system. *Journal of Food Safety*, **2**(4):221-233.
- Tempest DW & Meers JL (1968). The influence of NaCl concentration of the Medium on the Potassium Content of *Aerobacter aerogenes* and on the Inter-relationships between

- Potassium, Magnesium and Ribonucleic Acid in Growing Bacteria. *Microbiological Research Establishment*, **54**:319-325.
- Theys TE, Geeraerd AH, Devlieghere F & Van Impe JF (2010). On the selection of relevant environmental factors to predict microbial dynamics in solidified media. *Food Microbiology*, **27**(2):220-228.
- Theys TE, Geeraerd AH, Verhulst A, Poot K, Bree IV, Devlieghere F, Moldenaers R, Wilson D, Brocklehurst T & Van Impe JF (2008). Effect of pH, water activity and gel micro-structure, including oxygen profiles and rheological characterization, on the growth kinetics of Salmonella Typhimurium. *International Journal of Food Microbiology*, **128**(1):67-77.
- Van de Lagemaat J & Pyle D (2001). Solid-state fermentation and bioremediation : development of a continuous process for the production of fungal tannase. *Chemical Engineering Journal*, **84**:115-123.
- Verdy R (2008). Etude de la fermentation de filets de viande de boeuf après immersion dans une solution concentrée. Impact du niveau de la déshydratation sur les cinétiques de fermentation. Génie agroalimentaire méditerranéen et tropical. Ecole nationale supérieure des industries agricoles et alimentaires. p. 76.
- Verluyten J, Messens W & De Vuyst L (2003). The Curing Agent Sodium Nitrite, Used in the Production of Fermented Sausages, Is Less Inhibiting to the Bacteriocin-Producing Meat Starter Culture Lactobacillus curvatus LTH 1174 under Anaerobic Conditions. *Applied and Environmental Microbiology*, **69**(7):3833-3839.
- Xue M, Liu D, Zhang H, Qi H & Lei Z (1992). A pilot process of solid state fermentation from sugar beet pulp for the production of microbial protein. *Journal of Fermentation and Bioengineering*, **73**(3):203-205.

TABLE DES ANNEXES

Annexe 1: Procédé innovant de salaison appliqué à des filets de viande de bœuf et pour un exemple de conditions expérimentales de DII	52
Annexe 2 : Schémas des 3 types de bioréacteur à tambour.....	53
Annexe 3 : Schéma du réacteur à couche profonde	54
Annexe 4 : Organisation dans le temps d'une cinétique avec des prélèvements toutes les trois heures	55
Annexe 5 : A_w du milieu MYG en fonction de sa concentration en glycérol	56
Annexe 6 : Concentration en acide lactique non-dissocié (AH) dans le milieu MYG en fonction du pH.....	57

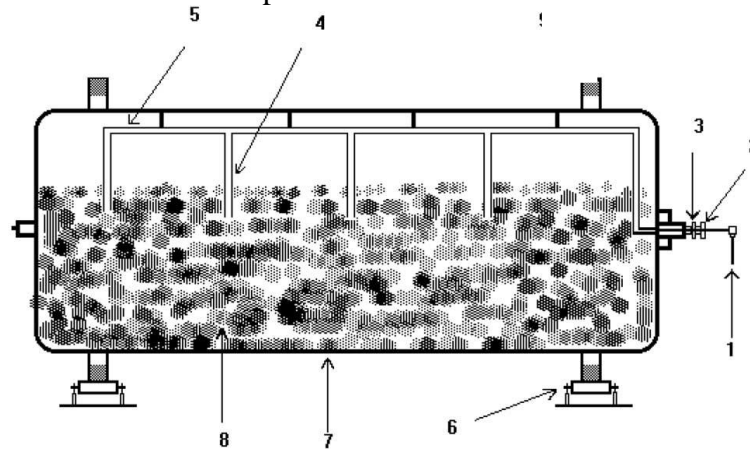
Annexe 1: Procédé innovant de salaison appliqué à des filets de viande de bœuf et pour un exemple de conditions expérimentales de DII



- Caractéristiques d'un produit type saucisson sec, viande de grisons

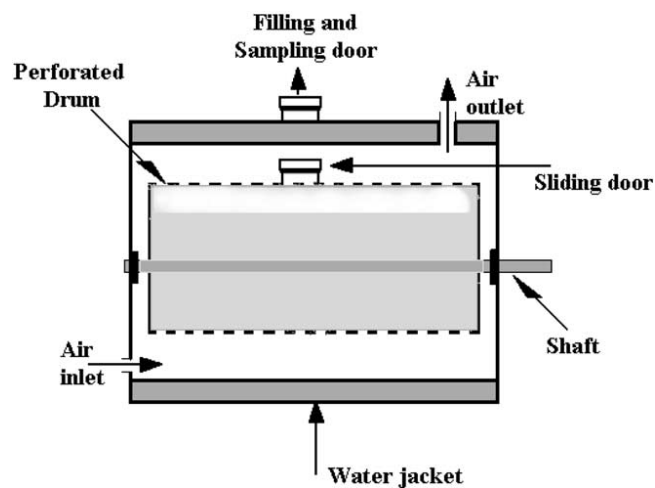
Annexe 2 : Schémas des 3 types de bioréacteur à tambour

- Réacteur à tambour rotatif simple

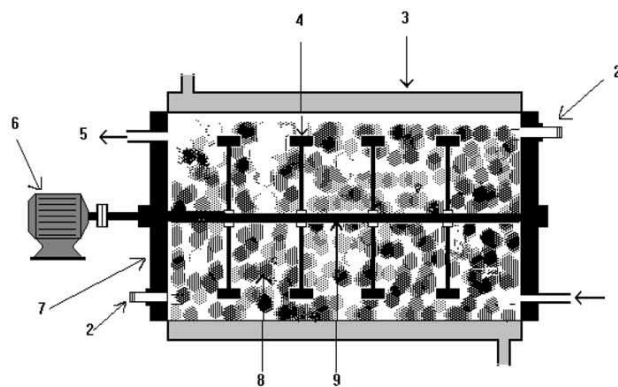


(1) entrée d'air, (2 ; 3) valves d'entrée d'eau, (4) sortie d'air, (5) tuyau d'air, (6) roulette, (7) tambour rotatif, (8) milieu solide.

- Réacteur à tambour rotatif perforé

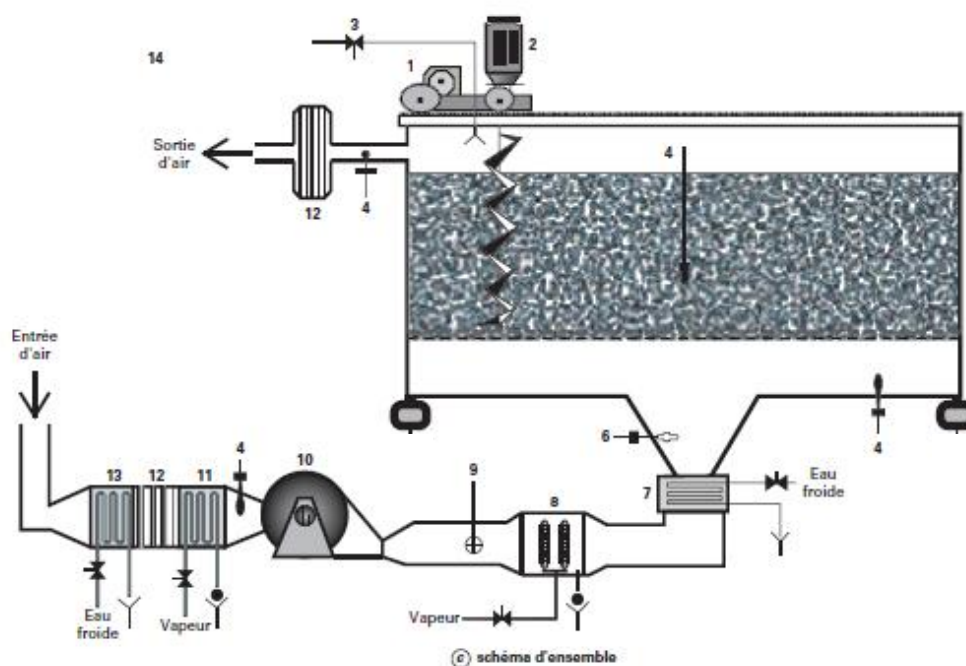


- Réacteur à tambour rotatif à pales



(1) entrée d'air, (2) sonde température, (3) réservoir d'eau, (4) pales d'agitation, (5) sortie d'air, (6) moteur, (7) réacteur (8) milieu solide, (9) axe de rotation des pales

Annexe 3 : Schéma du réacteur à couche profonde



1. moteur de déplacement du chariot
2. moteur d'agitation
3. valve pour l'inoculation et l'injection de l'eau
4. sondes de température
6. sonde d'humidité relative
7. refroidisseur
8. humidificateur par injection de vapeur
9. débitmètre à air
10. ventilateur
11. chauffage de l'air
12. filtre à air
13. refroidisseurs de l'air
14. schéma d'ensemble

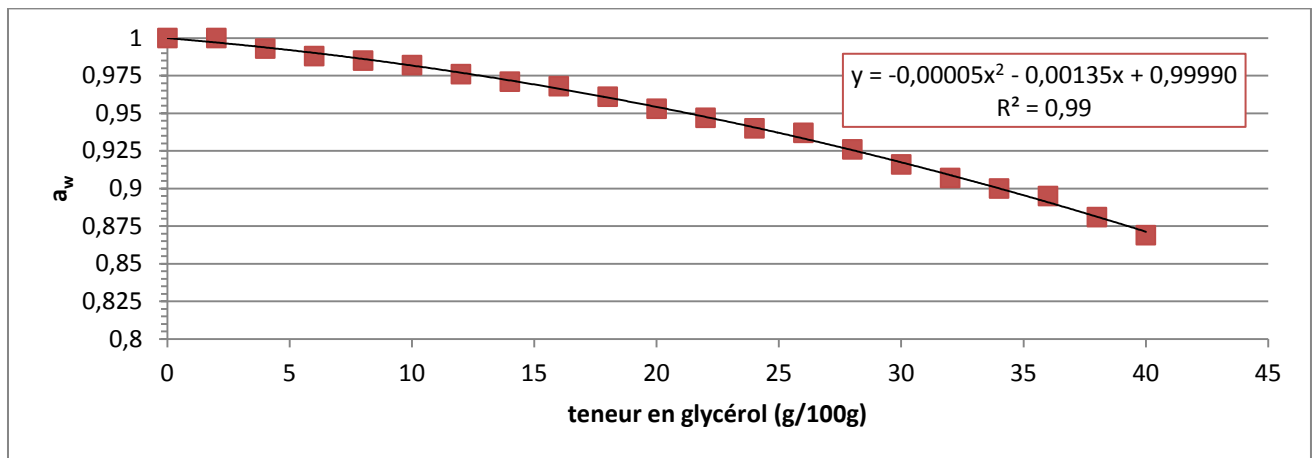
Annexe 4 : Organisation dans le temps d'une cinétique avec des prélèvements toutes les trois heures

Jour 1	6 h	7 h	8 h	9 h	10 h	11 h	12 h	13 h	14 h	15 h	16 h	17 h	18 h
Inoculation 1			Préparation du matériel et des milieux			Stérilisation				Pré-culture			Inoculation 1
Inoculation 2													
Jour 2	6 h	7 h	8 h	9 h	10 h	11 h	12 h	13 h	14 h	15 h	16 h	17 h	18 h
Inoculation 1	<u>12 h</u>			<u>15 h</u>			<u>18 h</u>			<u>21 h</u>			<u>24 h</u>
Inoculation 2	Pré-culture			<u>Inoculation 2</u> <u>0 h</u>			<u>3 h</u>			<u>6 h</u>			<u>9 h</u>
Jour 4	6 h	7 h	8 h	9 h	10 h	11 h	12 h	13 h	14 h	15 h	16 h	17 h	18 h
Inoculation 1												Dénombrement des boîtes de pétri; décontamination du matériel	
Inoculation 2													

Une cinétique est organisée sur quatre jours :

- le jour 1 est destiné à la préparation du matériel et des milieux et à l'inoculation des dispositifs devant être incubés plus de 9 h ;
- le jour 2 est destiné à l'inoculation des points incubés moins de 9 h et à la réalisation des points de la cinétique ou chaque heure correspond à un point (ex : le point de la cinétique 12 h est réalisé à 6 h du matin) ;
- le jour 4 est destiné au dénombrement des boîtes de Pétri et à la décontamination du matériel.

Annexe 5 : a_w du milieu MYG en fonction de sa concentration en glycérol



Cette courbe a été obtenue en mesurant l' a_w de solutions de MYG (200 ml par échantillon) contenant des quantités croissantes de glycérol. La relation obtenue est de la forme :

$$a_w = ax^2 + bx + c$$

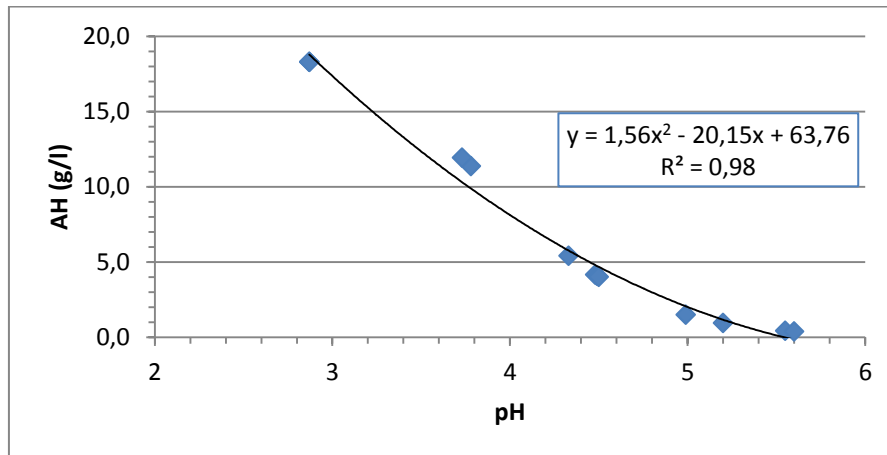
Avec x : teneur en glycérol (g/100g)

Lors de la réalisation des manipulations, afin de déterminer la quantité de glycérol (x) à ajouter pour obtenir la valeur d' a_w désirée, il faut résoudre l'équation du second degré $y = ax^2 + bx + c - a_w$ en calculant le déterminant Δ ($\Delta = b^2 - 4ac$):

- Si $\Delta < 0$: il n'y a pas de solution ;
- Si $\Delta = 0$: il y a une unique solution ;
- Si $\Delta > 0$: deux solutions sont possibles (x_1 et x_2): une est positive et l'autre est négative. Seule la réponse positive est intéressante dans le cas d'ajout de glycérol. Les solutions se calculent de la manière suivante :

$$x_1 = \frac{-b + \sqrt{\Delta}}{2a} \text{ et } x_2 = \frac{-b - \sqrt{\Delta}}{2a}$$

Annexe 6 : Concentration en acide lactique non-dissocié (AH) dans le milieu MYG en fonction du pH



Cette courbe a été obtenue en préparant du bouillon MYG contenant 20 g/l d'acide lactique qui ont été neutralisés progressivement avec une solution de NaOH à 5 mol/l. Pour chaque ajout de soude la valeur du pH a été mesurée, ce qui a permis de calculer la concentration en acide lactique non-dissocié (AH en g/l) en fonction du pH grâce à la formule :

$$pH = pK_{A^-/AH} + \log \frac{A^-}{AH}$$

Avec A^- : concentration en acide lactique dissocié (g/l)

AH : concentration en acide lactique non-dissocié (g/l)

$pK_{A^-/AH} = 3,9$

La courbe obtenue est de la forme $\Delta AH = a(pH)^2 + b(pH) + c$

Lors de la réalisation des manipulations, un pH cible est déterminé (4,7) : grâce à l'équation de la courbe, la teneur en acide lactique non-dissocié peut être déduite. Le résultat est obtenu pour une concentration en acide lactique initiale de 20 g/l. Connaissant la proportion d'AH (18%) dans la solution à pH 4,7, il suffit d'adapter la concentration en acide lactique initiale pour obtenir la concentration en AH voulue.